Isolierung und Lokalisierung Y-chromosomaler DNA von Drosophila hydei über die Methode der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexander Awgulewitsch
aus Bielefeld (NRW)

Düsseldorf 1984

Isolierung und Lokalisierung Y-chromosomaler DNA von *Drosophila hydei* über die Methode der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Awgulewitsch

aus Bielefeld (NRW)

Düsseldorf

1984

Inhaltsverzeinis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	5
1.	Abkürzungen	5
2.	Verwendete Lösungen und Enzyme	5
3.	Aufzucht und genetische Konstitution der verwendeten D. hydei-Stämme	7
4.	Anzucht von E. coli-Zellen für die Amplifizierung von Lambda-Phagen	8
5.	DNA-Isolierung	9
5.1	Isolierung von DNA aus Fliegen	9
5.2	Isolierung von DNA aus E. coli-Zellen	10
5.3	Isolierung von DNA aus Lambda-Phagen	12
5.3.1.	DNA-Präparation über Mini-Lysate	12
5.3.2.	DNA-Präparation nach vorheriger Reinigung der Phagen durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation	12
6.	Ultraschallbehandlung von DNA	14
7.	Schmelz- und Renaturierungsanalysen	15
8.	Immobilisierung von DNA durch kovalente Kupplung an ein makroporöses Trägermaterial	15
8.1	Kupplung an Sephacryl S-500 über Aktivierung mit BrCN	16
8.2	Kupplung an Sephacryl S-500 über Diazotierung	17
9.	DNA-Fraktionierung	19
9.1	Fraktionierung über Hydroxylapatit	19
9.1.1.	Fraktionierung der Gesamt-DNA in repetitive und "unique" Sequenzen	19

9.1.2.	Trennung der repetitiven DNA in hoch- und mittelrepetitive Sequenzen	20
9.2.	Fraktionierung über heterogene DNA/DNA-Hybridisierung	22
10.	"Screening" einer Lambda-Phagen-Bibliothek des D. hydei-Genoms	23
11.	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Proben	26
11.1.	"Nick"-Translation von klonierter DNA aus Lambda-Phagen	26
11.1.1.	Tritium-Markierung zur Herstellung von DNA-Proben für in situ-Hybridisierungen	26
11.1.2.	^{32}P-Markierung zur Herstellung von DNA-Proben für Filterhybridisierungen	27
11.2	Radioaktive Markierung von renaturierter DNA	28
11.2.1.	Tritium-Markierung	28
11.2.2.	^{32}P-Markierung	29
12.	Szintillationszählung	29
13.	Restriktionsanalyse von DNA und Transfer auf Nitrocellulose-Filter	29
13.1.	Verdauung durch Restriktionsenzyme	29
13.2.	Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente	31
13.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	31
13.4.	Transfer auf Nitrocellulose-Filter	32
14.	DNA/DNA-Filterhybridisierung - Autoradiographie	32
15.	Quantifizierung autoradiographischer Signale	33
16.	In situ-Hybridisierungen an Metaphase-Chromosomen	33
16.1.	Herstellung von Mitose-Präparaten	33

16.2.	Vorbehandlung der Präparate	34
16.3.	Hybridisierung an Metaphase-Chromosomen	34
16.4.	Autoradiographie und Färbung	35
III.	ANREICHERUNG Y-SPEZIFISCHER DNA-SEQUENZEN AUS D. HYDEI - ERGEBNISSE	37
1.	Einführung in die Problematik	37
1.1.	Komplexität des D. hydei-Genoms	38
1.2.	Schema zur Fraktionierung von D. hydei-DNA	41
2.	Vorfraktionierung der Gesamt-DNA über Hydroxylapatit	41
3.	Vorhybridisierung	44
4.	Anreicherungshybridisierung	53
4.1.	Bestimmung theoretischer Anreicherungsfaktoren	53
4.2.	Versuche zur Beschleunigung der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierungsreaktion	56
4.3.	Ergebnisse der Anreicherungshybridisierung	59
4.3.1.	Hochrepetitive DNA	60
4.3.2.	Mittelrepetitive DNA	62
4.3.3.	"Unique"-DNA	63
4.4.	Schmelzanalysen	64
5.	Versuche zur Bestätigung der Anreicherung Y-chromosomaler DNA	67
5.1.	Hybridisierung von HR_Y- und MR_Y-DNA mit genomischer DNA aus Männchen und Weibchen	67
5.2.	In situ-Hybridisierungen von HR_Y-DNA an Metaphase-Chromosomen	68

IV.	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG Y-SPEZIFISCHER, HOCHREPETITIVER DNA-SEQUENZEN	70
1.	Identifizierung und Isolierung "Y-spezifischer" Phagen-Klone	70
2.	Charakterisierung der isolierten Y_L- und Y_S-Klone	74
2.1.	Hybridisierung gegen DNA aus Männchen und Weibchen	74
2.2.	Kreuzhybridisierungen	77
3.	Lokalisierung der Y_S- und der Y_L-Sequenzen auf dem Y-Chromosom und in Interphasekernen	80
3.1.	Filterhybridisierungen gegen Genotypen mit verschiedenen Fragmenten des Y-Chromosoms	80
3.2.	Hybridisierungen *in situ* an Mitose-Chromosomen und an Interphasekernen	83
4.	Quantifizierung der Y_S-Sequenzen im Genom von *D. hydei*	88
V.	DISKUSSION	90
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	100
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	101
VIII.	ANMERKUNGEN	106
IX.	LEBENSLAUF	107

I. EINLEITUNG

Das Y-Chromosom von Drosophila hydei weist in verschiedenen Zell- und Entwicklungsstadien bestimmte morphologische Merkmale auf, die offenbar seine genetische Funktion charakterisieren. In Interphasekernen somatischer Gewebe ist es ein Bestandteil des Heterochromatins im Chromozentrum. Während der mitotischen Metaphase kommt sein vollständig heterochromatischer Charakter durch eine stark kondensierte Struktur zum Ausdruck, durch die es eindeutig von den Autosomen und vom euchromatischen Arm des X-Chromosoms zu unterscheiden ist. Bei der Bildung von polytänen Chromosomen verbleibt das kaum polytänisierte Y-Chromosom zusammen mit heterochromatischen Bereichen anderer Chromosomen ebenfalls im Chromozentrum.

Insgesamt deutet der heterochromatische Charakter des Y-Chromosoms in den Zellen des Somagewebes auf eine geringe Genzahl hin. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten außer einer begrenzten Anzahl von sog. Fertilitätsfaktoren (Hess, 1965), sowie zweier rRNA-Gengruppen (Schäfer und Kunz, 1975), bisher auch keine weiteren Gene auf diesem Chromosom lokalisiert werden.

Während der ersten meiotischen Prophase in den primären Spermatocyten durchläuft das Y-Chromosom allerdings ein Stadium besonderer genetischer Aktivität, welches gekennzeichnet ist durch die Ausbildung von sieben bis acht auffälligen, lichtmikroskopisch deutlich erkennbaren und morphologisch distinkten Lampenbürstenschleifenpaaren (Hess und Meyer, 1968). Die zahlreichen, vom X-Chromosom und von den Autosomen in diesem Entwicklungsstadium der männlichen Keimbahnzellen ausgebildeten Schleifenstrukturen sind hingegen nur elektronenmikroskopisch auflösbar (Glätzer, 1975; Glätzer und Meyer, 1981).

Die Bildungsorte der sehr großen (ca. 50 µm Länge) Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen sind eng mit den bekannten Fertilitätsfaktoren korreliert (Hess, 1967). Für die Ent-

wicklung fertiler Spermien ist das Vorhandensein aller dieser Schleifenbildungsorte, sowie die vollständige Ausbildung der unterschiedlichen Schleifenstrukturen essentiell. Ihre Ausfaltung ist daher als Ausdruck einer phasen- und gewebespezifischen Aktivierung der Fertilitätsfaktoren während der Spermiogenese aufzufassen (Hess, 1968, 1970).

Die Y-chromosomale DNA umfaßt etwa 9 - 10% des Genoms von D. hydei-Männchen (Hennig, 1972; Zacharias et al., 1982). Sie ist für die Entwicklung phänotypisch unveränderter Individuen nicht essentiell, wie durch die Existenz von, allerdings sterilen, X/O-Männchen bewiesen wird.

Aus diesen genetischen und cytologischen Beobachtungen ist zu schließen, daß sich die genetische Funktion des Y-Chromosoms hauptsächlich auf die Steuerung der Spermiogenese beschränkt. Die genannten typischen Merkmale lassen das Y-Chromosom von D. hydei als ein geeignetes, weil überschaubares System erscheinen, um die Steuerung von Genaktivierungsprozessen in eukaryotischen Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums zu untersuchen. In diesem Zusammenhang könnte insbesondere die Funktion heterochromatischer Strukturen bei der Regulation genetischer Aktivität näher analysiert werden. Um die Korrelation zwischen Struktur und Funktion auf molekularer Ebene auflösen zu können, ist die Kenntnis der Organisation Y-chromosomaler DNA-Sequenzen Voraussetzung.

Trotz der charakteristischen Besonderheiten des Y-Chromosoms gibt es bisher nur wenig Informationen über seinen molekularen Aufbau. Das ist im wesentlichen sicherlich darin begründet, daß es lange Zeit nicht möglich war, Y-spezifische DNA-Sequenzen oder Y-spezifische RNA-Spezies zu isolieren. So konnten Y-chromosomale Transkripte zwar nachgewiesen (Hennig, 1968; Glätzer und Meyer, 1981) und bestimmten Schleifenstrukturen zugeordnet werden (Glätzer und Meyer, 1981; Herrnstadt, 1982), ihre Isolierung blieb jedoch bisher erfolglos.

Heterochromatische Chromosomenstrukturen enthalten normalerweise einen hohen Anteil hochrepetitiver Sequenzen und sind häufig mit Satelliten-DNA assoziiert (Zusammenfassung: Gall, 1981). Daher wurde angenommen, daß auch am Aufbau des Y-Chromosoms spezifische Satellitensequenzen maßgeblich beteiligt sind. Eine Fraktionierung der D. hydei-DNA durch isopyknische Zentrifugation in Salzgradienten unter Zusatz von DNA-bindenden Metallionen und Farbstoffen führte allerdings nicht zur Isolierung derartiger Y-spezifischer Komponenten (Renkawitz, 1977, 1978). Daraus wurde geschlossen, daß im Gegensatz zu sonstigen Fällen das heterochromatische Y-Chromosom keinen hohen Anteil an hochrepetitiver DNA enthält. Durch vergleichende Renaturierungsanalysen (Hennig, 1972) wird dieser Befund gestützt.

Ergebnisse aus jüngster Zeit (Lifschytz, 1979; Vogt und Hennig, 1983; Lifschytz et al., 1983) deuten darauf hin, daß die Y-chromosomale DNA vielmehr durch mittelrepetitive Sequenzen dargestellt wird. Einzelne dieser Sequenzen konnten durch DNA/RNA-Hybridisierungen in situ an Spermatocytenkernpräparaten mit bestimmten Schleifenstrukturen korreliert werden.

Die meisten der Y-chromosomalen Sequenzen von D. hydei kommen möglicherweise auch auf anderen Chromosomen vor (Knust, 1979; Vogt und Hennig, 1983). Diese Hypothese wird durch eine vergleichende zweidimensionale Restriktionsanalyse von Männchen- und Weibchen-DNA eines verwandten Organismus, D. melanogaster, gestützt (Smith und Thomas, 1981). Unter 2.500 - 4.000 Restriktionsfragmenten konnten nur etwa 10 als männchenspezifisch identifiziert werden.

Die genannten Fakten machen deutlich, daß die Basis für die Aufklärung der Substruktur des Y-Chromosoms auf molekularer Ebene weniger günstig ist, als es cytologisch zunächst den Anschein hat. Für weitergehende Analysen der Organisation des Y-Chromosoms von D. hydei schien es daher sinnvoll zu sein, einen neuen Weg zur Isolierung Y-spezifischer Sequenzen zu versuchen. Dabei wurde hypothetisch von der Existenz solcher Sequenzen ausgegangen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in dem Versuch der Anreicherung und Isolierung Y-chromosomenspezifischer Sequenzen auf dem Wege der heterogenen DNA/DNA-Sättigungshybridisierung zwischen immobilisierter DNA aus Weibchen (X/X) und mobiler DNA aus Männchen (X/Y). Die wesentlichen Parameter der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung waren zuvor nur an prokaryotischer DNA aus E. coli eingehend untersucht worden (Bünemann et al., 1982; Bünemann, 1982). Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurde diese Methode in Verbindung mit Klonierungstechniken erstmals zur Isolierung spezifischer DNA-Sequenzen eines eukaryotischen Genoms von etwa 50-facher Komplexität angewendet.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Abkürzungen

APTE	Aminophenylthioäther
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zählwerte pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPTE	Diazophenylthioäther
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Gardol	N-Lauroyl-Sarkosinat
h	Stunden
HAP	Hydroxylapatit
HR-DNA	hochrepetitive DNA
kb	Kilobasen
min	Minuten
MR-DNA	mittelrepetitive DNA
NO	Nucleolus Organisator
O.D.	optische Dichte
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Rotorumdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U-DNA	"unique"-DNA

2. Verwendete Lösungen und Enzyme

Denhardt-Medium: 0.02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 0.02% (w/v) Ficoll, 0.02% (w/v) BSA. (Denhardt, 1966).

Drosophila-Ringer: 0.182 M KCl, 0.046 M NaCl, 0.003 M $CaCl_2$, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.2.

LB-(Luria-Bertani-)Medium: 10 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l Bacto-yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7.5 (NaOH).

LB-Agarose: 15 g Bacto-Agar auf 1l 2 x LB Medium.

LB-Topagarose: 1 g Bacto-Agar auf 1l 2 x LB Medium.

Phenol-Reagenz: Kristallines Phenol wurde mehrmals mit 1 M Tris-HCl, pH 8.0 und anschließend mit 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 extrahiert bis der pH >7.5 war. Die Phenolphase wurde mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und bei 5°C unter 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 gelagert.

Sinsheimer Medium: 9.9 g Casamino acids (Difco) in 837 ml Wasser autoklavieren; sterile Zugabe folgender, einzeln autoklavierter Lösungen: 90 ml 10-fach konzentrierten Stammpuffer (70 g/l Na_2HPO_4, 30 g/l KH_2PO_4), 1.5 ml 5 M NaCl, 9.0 ml 10% (w/w) NH_4Cl, 36.0 ml 10% (w/w) Glucose, 20 ml 20% (w/w) Maltose, 5 ml 1 M $MgCl_2$.

SM-Medium: 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.008 M $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.01% (w/v) Gelatine, pH 7.5.

SSC (Standard Saline Citrate): 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Citrat, pH 7.

SSM: Shields and Sang Medium für Drosophila-Zellkulturen (Shields und Sang, 1977), wurde freundlicherweise von Dr. W. Liebrich zur Verfügung gestellt.

TE-Puffer: 0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 8.0.

TEACl-(Tetraäthylammoniumchlorid-)Puffer: Zur Herstellung einer 3 M Stammlösung wurde die konzentrierte wässrige Lösung zunächst mit einigen Tropfen 2 M Tris auf pH 7.5 titriert und nach Einstellung der Endkonzentration über Aktivkohle gereinigt und filtriert (0.22 µm Filter, Millipore). Mit 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 wurde auf 2.4 M verdünnt.

TES-Puffer: 0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, 0.1 M NaCl, pH 8.0.

Enzyme

ß-Amylase (Merck)
DNA-Polymerase I aus E. coli (BRL)
DNA-Polymerase I aus E. coli, Klenow Fragment (BRL)
DNaseI aus Pankreas (Merck) als Stammlösung: 50 ng/ml H_2O.
Nuclease aus S. aureus (Boehringer) als Stammlösung: 0.2 mg/ 50 µl 0.05 M Na-Borat, pH 8.8, 0.001 M $CaCl_2$.
Proteinase K aus Pilzen (Merck) als Stammlösung: 20 mg/ml H_2O.

Restriktionsenzyme: Alu I (Boehringer)
Bam HI (BRL)
Eco RI (Boehringer)
Hae III (Biolabs)
Hha I (Biolabs)
Hind III (Boehringer)
Hpa II (Boehringer)
Pst I (BRL)
Sal I (Boehringer)
Sau 3A (BRL)
Taq I (Boehringer)

RNase A aus Rinderpankreas (Boehringer) als Stammlösung: 10 mg/ml 2 x SSC. Vor dem erstmaligen Gebrauch wurde die Lösung für 10 min auf 100°C erhitzt und anschliessend langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt.

3. Aufzucht und genetische Konstitution der verwendeten D. hydei-Stämme

Die Fliegen wurden bei 23°C in Plastikflaschen auf einem Nährmedium aus Agar, Maismehl, Sojamehl, Zuckerrübensirup, Malzextrakt, Trockenbierhefe und Wasser (Zubereitung: Hess, 1976) gezogen. Die Fütterung der Larven wurde ergänzt durch den Zusatz frischer Bäckerhefe.

Für die Untersuchungen wurden Stämme aus den Zuchten von Prof. Dr. O. Hess mit den folgenden genetischen Konstitutionen verwendet:

1) Wildtyp X/X x X/Y

2) Translokationsstämme (Hess, 1967, 1968)

- 697/16: XX/$Y^{S \cdot KT}$-A x X·Y^{FP}/$Y^{S \cdot KT}$-A
- 290/2: XX/A·Y^{FP} x $Y^{S \cdot KT}$-X/A·Y^{FP}

Die markierten "attached"-X-Weibchen dieser beiden Stämme erzeugen nach Kreuzung mit Wildtyp-Männchen Söhne der Genotypen X/$Y^{S \cdot KT}$-A bzw. X/A·Y^{FP}. Diese enthalten jeweils nur einen Teil des kompletten Y-chromosomalen Schleifensatzes, nämlich entweder Schlingen (S), Keulen (K) und Tubulibänder (T), oder aber nur Fäden (F) und Pseudonucleolus (P). Die beiden hier verwendeten translocierten Y-Fragmente gehören zu einem Paar reziproker X-Autosomen-Translokationschromosomen. Die beiden Fragmente sind also Bruchstücke eines kompletten Y-Chromosoms.

- 340/2: XX/Y x $Y^{S \cdot K}$-X/Y
- 290/1: XX/Y x Y^{S}·X/Y

Zur Erzeugung von Söhnen der Genotypen $Y^{S \cdot K}$-X/O bzw. Y^{S}·X/O werden die Männchen beider Stämme mit w^{m1}/O-Weibchen (Beck, 1976) gekreuzt. Diese Männchen enthalten aus dem Satz der Y-chromosomalen Schleifen nur die Schlingen und die Keulen bzw. nur die Schlingen allein.

4. Anzucht von E.coli-Zellen für die Amplifizierung von Lambda-Phagen

Frisch angeimpfte Kulturen von E. coli K 802 in 20 ml 2 x LB-Medium, 0.2% Maltose wurden über Nacht bei 37°C auf einer Schüttelmaschine inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Polyäthylen-Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Beckman J-21C Kühlzentrifuge abzentrifugiert (JS 13-Rotor, 5000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml 0.01 M $MgCl_2$

suspendiert und zur weiteren Verwendung für maximal 4 Wochen bei $4^{o}C$ gelagert (E. coli K 802-Suspension).

5. DNA-Isolierung

5.1. Isolierung von DNA aus Fliegen

Die Präparation von Fliegen-DNA erfolgte nach Schwochau (1979) durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation. 1 - 2 g gehungerte (48 h) und bei $-20^{o}C$ eingefrorene adulte Fliegen (1 g entsprechen etwa 1000 Fliegen) wurden unter flüssigem Stickstoff in einem silikonisierten Porzellanmörser zu feinem Staub zerrieben. Das tiefgefrorene Pulver wurde entsprechend der Fliegenmenge in 11.5 - 10.5 ml eines $60^{o}C$ warmen Aufschlußpuffers (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 0.03 M 2-Mercaptoäthanol, 1% (w/v) Gardol, pH 7.9) unter Zusatz von 0.5 - 1.0 mg Proteinase K aufgenommen und schnell durchmischt. Für die Inkubation bei $53^{o}C$ für 3 - 4 h wurde das Gemisch in Polyallomerröhrchen, passend zum Beckman VTi 50-Rotor, gefüllt.

Anschließend erfolgten 2 CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen. Für die erste Zentrifugation wurde mit einer bei $20^{o}C$ in 0.1 x SSC gesättigten CsCl-Lösung auf 62 - 63 g, einschließlich Röhrchen, aufgefüllt und im VTi 50 Rotor in einer Beckman L5-75 Ultrazentrifuge für 20 - 40 h bei 41000 rpm und $20^{o}C$ zentrifugiert. Zur Vermeidung von Verwirbelungen des Gradienten wurde das Auslaufen des Rotors ab 500-1000 rpm ohne Bremsung durchgeführt. Der Röhrcheninhalt wurde mittels einer abgebrochenen Pasteurpipette bis etwa 1 cm oberhalb der Polysaccharidbande (weißliche, opalisierende Bande in der unteren Hälfte des Gradienten) abgesaugt. Mit einer glühenden Nadel wurde dann ein Loch in den Röhrchenboden gebohrt und die Lösung langsam bis auf 3 cm Füllhöhe ausgetropft. Die restliche Lösung mit der DNA wurde unter Ausschluß der an der zentripetalen Röhrchenwand haftenden Schicht aus Chitin und Fetten etc. und der an der zentrifugalen Röhrchenwand haftenden Schicht aus RNA langsam in ein neues Röhrchen gegossen.

Für den zweiten Gradienten wurde das neue Röhrchen mit einer auf eine Dichte von 1.70 g/cm^3 eingestellten CsCl-Lösung in 0.1 x SSC auf 63.5 g aufgefüllt und wieder bei 41000 rpm und 20°C für 20 - 40 h zentrifugiert. Die Gradientenfraktionierung erfolgte photometrisch über die Messung der Absorption bei 254 nm in einer 2 mm Durchflußküvette im ISCO-Gradientenanalysator (Typ 640 mit AbsorbanceMonitor UA5) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml/min. Zur Unterschichtung des Gradienten diente Fluorinert (ISCO) mit einer Dichte von 1.93 g/cm^3.

Das Absorptionsprofil des Gradienten bei 254 nm zeigt unter diesen Bedingungen 2 markante, deutlich voneinander getrennte "Peaks". Der "Peak" im Bereich einer Dichte von 1.702 g/cm^3 repräsentiert Hauptbanden-DNA, während der "Peak" bei 1.677 g/cm^3 Polysaccharide, mitochondrielle und AT-reiche, nucleare DNA darstellt (Zielke, 1978; Eckes, 1981). Die Fraktion der DNA-Hauptbande wurde für ca. 24 h gegen 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 mit mehrfachem Pufferwechsel dialysiert. Die Fraktion der Polysaccharidbande wurde entsprechend gegen 0.12 M Na-Phosphat, pH 6.8 dialysiert. Zur Trennung von Polysacchariden und DNA wurde das Dialysat bei Zimmertemperatur auf eine mit 0.12 M Na-Phosphat, pH 6.8 äquilibrierte Säule aus 1 - 2 g HAP gegeben. Nach dem Ausspülen der Polysaccharide aus der Säule mit dem gleichen Puffer wurde die adsorbierte DNA durch Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 0.3 M Na-Phosphat, pH 6.8 eluiert. Das Eluat wurde wie oben angegeben gegen 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 dialysiert und mit der Hauptbanden-DNA vereinigt.

5.2. Isolierung von DNA aus E. coli-Zellen

Die Isolierung bakterieller DNA erfolgte in Anlehnung an Marmur (1961) aus Zellen des E. coli-Stammes HB 101.

Die Suspension einer Bakterienkultur in 200 ml 2 x LB-Medium wurde nach Abschluß der logarithmischen Wachstumsphase in

einen 250 ml Polyäthylen-Zentrifugenbecher überführt und im JA 14-Rotor in der Beckman J-21C Kühlzentrifuge bei 5000 rpm für 20 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml 1 x SSC suspendiert und in ein verschraubbares 50 ml Polyäthylen-Zentrifugenröhrchen transferiert. Zum Aufschluß der Zellen wurde das Röhrchen nach Zugabe von 8 ml 0.25 M EDTA, 0.4 ml einer 25%-igen (w/w) Lösung von SDS in Wasser und 20 mg Proteinase K in 2 ml TES-Puffer für 30 min bei 33 - 37°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden im Anschluß daran 5 ml 5 M Natriumperchlorat und 15 ml einer Mischung aus Chloroform und Isoamyl-Alkohol, 24:1 (v/v) zugesetzt und das Röhrchen für 20 min bei Zimmertemperatur auf einer Schüttelmaschine bewegt.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 9000 rpm für 20 min im JA 20-Rotor von Beckman. Die wässerige Phase wurde mit einer abgebrochenen Pasteurpipette abgehebert und in einem 100 ml Meßzylinder vorsichtig mit 96% Äthanol überschichtet. Durch stetiges Rühren mit einem Glasstab wurde die an der Phasengrenze fädig ausfallende DNA aufgewickelt und anschließend in 10 ml TE-Puffer von dem Glasstab gelöst. Nach vollständiger Lösung erfolgte eine Behandlung mit 1 mg Ribonuclease A und mg ß-Amylase bei 37°C für 30 min. Im Anschluß daran wurde die Lösung auf Eis gesetzt und festes Natriumperchlorat bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 5 Mol/l zugefügt. Darauf erfolgte eine erneute Äthanol-Fällung (s.o.). Die gefällte DNA wurde wieder in 10 ml TE-Puffer gelöst und unter Zusatz von 1 mg Proteinase K für 2 h bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml TES-Puffer wurde zweimal mit 20 ml Phenol-Lösung phenolisiert. Die Phasentrennung erfolgte jeweils durch Zentrifugation im JA 20-Rotor bei 9000 rpm und 20°C für 5 min. Durch zwei Ähtanol-Fällungen wie o.a. wurde die DNA von Phenol-Resten befreit.

5.3. Isolierung von DNA aus Lambda-Phagen

5.3.1. DNA-Präparation über Mini-Lysate

Für eine Schnell-Präparation von klonierter DNA aus Lambda-Phagen (Cameron et al., 1977) wurde die Topagarose einer konfluenten, vollständig klaren Phagen-Platte (Durchmesser: 8,5 cm) mit einem Glasspatel abgeschabt und in einem 15 ml Corex-Röhrchen mit 2 ml SM-Puffer und 1 ml Chloroform suspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde im JA 20-Rotor von Beckman bei 10000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der wässerige Überstand wurde in einem neuen Corex-Röhrchen für 15 min bei Zimmertemperatur mit 10 µg RNase A behandelt. Nach Zugabe von 0.4 ml SDS-Mix (0.5 M Tris-HCl, 0.25 M EDTA, 2.5% w/w SDS, pH 8.3) erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 65°C. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gesetzt und mit 0.5 ml 8 M Kaliumacetat für 15 min gefällt.

Nach der Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C für 15 min wurde der Überstand in ein silikonisiertes Corex-Röhrchen überführt und die DNA mit 5 ml Äthanol bei -20°C für 20 min gefällt. Im Anschluß an die Zentrifugation (JA 20-Rotor, 10000 rpm, 4°C, 10 min) wurde das Pellet in 0.3 ml Wasser gelöst und die DNA in einem Eppendorf-Gefäß unter Zugabe von 0.1 ml 7.5 M Ammoniumacetat ein zweites Mal mit Äthanol gefällt. Nach der Pelletierung wurde die DNA in 200 µl 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 aufgenommen, mit 20 µl 5 M NaCl versetzt, phenolisiert und abschließend gefällt. Nach zweimaliger Extraktion mit 70% Äthanol wurde das getrocknete Pellet in 100 µl 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 gelöst. Für eine Restriktionsanalyse wurde 1/10 des Volumens eingesetzt.

5.3.2. DNA-Präparation nach vorheriger Reinigung der Phagen durch CsCl-Dichtegradienten Zentrifugation

Für die Bereitstellung einer größeren Menge (50 - 100 µg) an

reiner DNA aus einzelnen Phagen-Klonen wurde nach Thomas und Davis (1975) verfahren, indem die Phagen-Partikel über CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt wurden. Durch Phenolisierung wurde die Phagen-DNA von den Proteinen getrennt.

4 ml einer frischen, maximal 4 h alten E. coli K 802-Suspension (s. II. 4.) wurden mit ca. 2 x 10^9 Lambda-Phagen in 4 ml SM-Medium angeimpft und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die E. coli/Phagen-Suspension in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml bei 37°C vorgewärmten Sinsheimer Medium gegeben und bei 37°C auf der Schüttelmaschine inkubiert. Im Anschluß an die Lyse der E. coli-Zellen, welche nach einer Inkubationszeit von ca. 6 h beendet war (erkenntlich an den Flocken lysierter Bakterien), wurde der Suspension 1 ml Chloroform zugesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Suspension wurde dann in einen 250 ml Polyäthylen-Zentrifugenbecher mit Schraubverschluß überführt und im JA 14-Rotor von Beckman bei 7000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Transfer des phagenhaltigen Überstandes in einen neuen Zentrifugenbecher wurden 12 g NaCl zugegeben und vollständig gelöst. Erst darauf folgte die Zugabe und Lösung von 14 g Polyäthylenglykol (Molekulargewicht: 6000 - 7500 Dalton). Zur Ausfällung der Phagen wurde die Suspension über Nacht bei 4°C belassen. Anschließend wurde im JA 14-Rotor bei 7000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml TM 10-Puffer (0.01 M Tris-HCl, 0.01 M $MgCl_2$, pH 7.5) für 15 - 30 min resuspendiert. Die Phagen-Suspension wurde in ein 15 ml Corex-Röhrchen gegeben und der Zentrifugenbecher mit 1 ml TE-Puffer nachgespült.

Es folgten zwei Zentrifugationen über vorgeformte CsCl-Stufengradienten, die durch vorsichtiges Übereinanderschichten von CsCl-Lösungen unterschiedlicher Dichte in Polyallomer-Röhrchen, passend zum SW 40-Rotor von Beckman, hergestellt wurden. Das CsCl war in einem Puffer von 0.02 M Tris-HCl, 0.001 M $MgSO_4$ und 0.1 mM EDTA, pH 8.0 gelöst. Für den ersten Stufengradienten wurden folgende Volumina an CsCl-Lösungen mit den

angegebenen Dichten der Reihe nach übereinandergeschichtet: 0.5 ml - 1.6 g/cm^3, 0.5 ml - 1.5 g/cm^3, 1 ml - 1.4 g/cm^3, 1 ml - 1.3 g/cm^3. 1.5 ml der Phagensuspension wurden vorsichtig auf den Gradienten gegeben und das verbleibende Volumen des Röhrchens mit Paraffinöl bis ca. 1 mm unter den Rand aufgefüllt. Nach einer Zentrifugationszeit von 60 - 120 min bei 30000 rpm und 20°C wurde das Paraffinöl abgehebert und die ca. 0.5 cm über dem Röhrchenboden befindliche, bläulich erscheinende Phagenbande mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig aus dem Gradienten herausgesaugt.

Die so erhaltene Suspension wurde mit dem gleichen Volumen einer gesättigten CsCl-Lösung in o.a. Puffer vermischt und 2 ml davon wurden in ein neues Polyallomerröhrchen gefüllt. Darüber wurden für den zweiten Stufengradienten die folgenden Volumina an CsCl-Lösungen mit den angegebenen Dichten geschichtet: 0.5 ml - 1.6 g/cm^3, 0.5 ml - 1.5 g/cm^3, 1 ml - 1.4 g/cm^3. Das Restvolumen des Röhrchens wurde wieder mit Paraffinöl aufgefüllt.

Nach der Zentrifugation, unter gleichen Bedingungen wie beim ersten Lauf, wurde die jetzt im oberen Drittel des Gradienten befindliche Phagen-Bande wieder mit einer Pasteur-Pipette herausgesaugt und bei 4°C gegen 100 - 200 ml eines Puffers von 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.025 M NaCl, 0.001 M $MgSO_4$ über Nacht dialysiert.

Zur Isolierung der Phagen-DNA wurde das Dialysat mit je 1/10 Volumen 5 M NaCl und 0.4 M EDTA versetzt und phenolisiert. Nach der Äthanol-Fällung und zweimaliger Extraktion in 70%-igem Äthanol wurde das DNA-Pellet im Vakuumschrank getrocknet, in 50 - 100 µl 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 aufgenommen, und bei -20°C gelagert.

6. Ultraschallbehandlung von DNA

Für die DNA-Fraktionierung war es notwendig, DNA-Moleküle mit einer einheitlichen Länge von durchschnittlich 300 - 800 bp

einzusetzen. Dazu wurden 0.5 - 1.0 mg nativer DNA in 1 ml einer Lösung von 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl für 4 x 30 sec mit der Microsonde eines Braun Labosonic 1510 unter Eiskühlung beschallt (Einstellung: 100 W; 50 Einheiten auf der Skala). Zur Abkühlung wurde die Beschallung jeweils für 30 sec unterbrochen. Der Metallstaub wurde im JA 20-Rotor von Beckman bei 10000 rpm, 10 min abzentrifugiert. Die Kontrolle der DNA-Länge erfolgte gelelektrophoretisch über den Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard.

7. Schmelz- und Renaturierungsanalysen

Schmelz- und Renaturierungsanalysen von DNA wurden photometrisch in einer verschraubbaren, Teflon-beschichteten Schmelzküvette durchgeführt, deren Thermostatierung elektrisch über Peltier-Elemente erfolgte. Zur Temperaturregelung diente ein Gilford 2527 Thermo-Programmer. Für Schmelzanalysen wurde eine Heizrate von $1^{\circ}C$/min eingestellt. Die Absorptionsänderungen bei 260 nm wurden durch ein Gilford Spektralphotometer (Typ 250) gemessen und mit einem Recorder 1100 von Gilford aufgezeichnet. Bei sehr hohen DNA-Konzentrationen von 0.5 - 1 mg/ml wurde die Schichtdicke der Küvette (1 cm Standard-Schichtdicke) durch Einführen von Quarzglasstopfen auf 0.2 - 0.1 cm reduziert. Für sämtliche Schmelz- und Renaturierungsanalysen wurde beschallte DNA mit einer durchschnittlichen Länge von 300 - 800 bp eingesetzt.

8. Immobilisierung von DNA durch kovalente Kupplung an ein makroporöses Trägermaterial

Unter Berücksichtigung der sterischen und kinetischen Parameter bei heterogenen Hybridisierungsreaktionen (Bünemann, 1982) wurde unter verschiedenen makroporösen Trägermaterialien Sephacryl S-500 von Pharmacia für die Immobilisierung von DNA aus *D. hydei* gewählt. Die DNA wurde entweder

über Aktivierung des Sephacryl S-500 mit BrCN (Arndt-Jovin et al., 1975) oder durch Diazotierung eines 2-Aminophenylthioäther-(APTE-) Derivats (Seed, 1982) von S-500 gekuppelt. Dabei wurde im einzelnen nach Vorschriften von Bünemann (1982) verfahren.

8.1. Kupplung an Sephacryl S-500 über Aktivierung mit BrCN

Etwa 1.5 g feuchtes S-500 Material wurden in einer 50 ml Glasfritte mit 3 -4 Frittenfüllungen destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 20 ml eiskaltem H_2O in einem 50 ml Becherglas suspendiert. Unter ständigem Rühren mittels eines Stabrührers wurde rasch 1 g BrCN zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode kontrolliert und für die Dauer der Aktivierung von 15 - 20 min mit 5 M NaOH auf pH 10.5 - 11.5 gehalten. Um die Temperatur unter 15°C zu halten, wurden gelegentlich kleine Eisstückchen zugegeben. Nach Abschluß der Reaktion, erkenntlich an einer stark verminderten Aufnahmegeschwindigkeit von NaOH, wurde das Material in die Fritte überführt und mit 3 Frittenfüllungen eiskaltem Wasser und einer Frittenfüllung eiskaltem 0.01 M K-Phosphat, pH 0.8 gewaschen. Für eine einzelne Kupplungsreaktion wurden 0.5 - 1.0 g des aktivierten, feuchten Materials zu 0.5 - 1.0 mg der beschallten, hitzedenaturierten (5 min 100°C, anschliessend auf Eis) DNA gegeben, welche in entsprechend 0.25 - 0.5 ml eiskaltem 0.01 M K-Phosphat, pH 8.0 gelöst war. Die Kupplungsreaktion erfolgte bei Zimmertemperatur für 2 - 3 Tage.

Zur Entfernung nicht gekuppelter DNA wurde auf der Glasfritte der Reihe nach mit 1 M K-Phosphat, pH 8.0, 0.01 M K-Phosphat, pH 8.0, 0.1 M NaOH, 0.1 M K-Phosphat, pH 8.0 und 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 gewaschen. Das Material wurde kurz trockengesaugt und das Gewicht der Feuchtmasse bestimmt.

Um die Menge an kovalent gekuppelter DNA zu bestimmen, wurde ein Aliquot von 0.02 - 0.05 g mit 0.1 M Na-Borat, pH 8.8 gewaschen und zur Behandlung mit 150 Einheiten Nuclease aus

S. aureus in 2 ml einer Lösung von 0.05 M Na-Borat, pH 8.8 und 0.001 M $CaCl_2$ über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde im Überstand die Absorption bei 260 nm bestimmt. 1.6 O.D. mit Nuclease verdauter DNA entsprachen 1.0 O.D. nativer DNA.

8.2. Kupplung an Sephacryl S-500 über Diazotierung

Die DNA-Kupplung über das Diazotierungsverfahren erfolgte in zwei Schritten.

a) Herstellung des APTE-Derivats von Sephacryl S-500

50 ml S-500 wurden in einem Buchner-Trichter mit 1 l destilliertem Wasser gewaschen. Etwa 35 g des feuchten Materials wurden in eine 100 ml Sovirel-Flasche überführt. Nach Zugabe von 35 ml 1 M NaOH und 3 ml 1.4-Butandioldiglycidyläther wurde die Suspension in der verschlossenen Flasche über Nacht auf der Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die wässerige Lösung in einem Buchner-Trichter so vollständig wie möglich abgesaugt. Mit einem breiten Spatel wurde das feuchte Material zusätzlich ausgepreßt, bevor es in die Flasche zurücktransportiert wurde. Nach Zugabe von 40 ml Aceton und 5 ml 2-Aminothiophenol wurde die Flasche verschlossen und wieder über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluß hieran wurde die Flasche unter dem Abzug geöffnet und das Material im Buchner-Trichter nacheinander mit je 200 ml Aceton, 0.1 M HCl und Wasser gewaschen. Das APTE-S-500 war nach der Suspension in H_2O bei einer Lagerungstemperatur von 4°C mehrere Monate verwendungsfähig.

b) Herstellung von Diazophenylthioäther-(DPTE-)S-500

Etwa 1.5 g feuchtes APTE-S-500 wurden mit 50 ml destilliertem Wasser in einer Glasfritte gewaschen und anschließend in einer Mischung aus 1.5 ml Wasser und 5 ml 1.8 M HCl suspendiert. Während die Suspension auf Eis gehalten wurde, erfolgte die Zugabe einer frisch angesetzten Na-Nitrit-Lösung in Wasser (10 mg/ml) in 20 µl Portionen. Der Na-Nitrit-Verbrauch und

damit der Verlauf der Diozotierungsreaktion an den jetzt gelb gefärbten Partikeln wurde durch den Farbumschlag von Stärke-Jodid-Papier verfolgt. Die Reaktion war nach etwa 20 - 30 min beendet, sobald die Farbreaktion positiv (dunkelblau) blieb. Insgesamt wurden dabei 140 - 160 µl $NaNO_2$ verbraucht.

Die Suspension wurde nun so schnell wie möglich in der vorgekühlten Fritte mit 100 ml eiskalten Wassers und anschliessend mit 15 ml eines eiskalten Gemisches aus 0.025 M Na-Phosphat, pH 6.0 und analytisch reinem DMSO von Merck, 20:80 (v/v), gewaschen. Unmittelbar danach wurden etwa 0.5 g des kurz abgesaugten, feuchten Materials zu 0.25 ml DNA-Lösung gegeben (10 ml Sovirel-Glas). Die DNA war ebenfalls in dem Gemisch aus 0.025 M Na-Phosphat, pH 6.0 und DMSO gelöst. Dazu wurde die beschallte und gefällte DNA (100 - 400 µg) zunächst in 50 µl des Phosphat-Puffers gelöst, bevor 200 µl DMSO zugegeben wurden. Die DNA wurde dabei durch das DMSO denaturiert, so daß eine Denaturierung durch Kochen entfiel. Die Kupplungsreaktion erfolgte über 2 - 3 Tage bei Zimmertemperatur.

Um die nichtgekuppelte DNA zu entfernen, wurde das Material auf der Glasfritte mit Wasser gewaschen, kurz abgesaugt und in einem 10 ml Sovirelglas mit 2 ml 0.4 M NaOH für 30 min bei 40°C inkubiert. Abschließend wurde auf der Glasfritte gründlich mit 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 gewaschen. Um die Menge der gekuppelten DNA zu bestimmen, wurde ein Aliquot des Feuchtmaterials mit Nuclease verdaut und die Absorption im Überstand bei 260 nm bestimmt (s. II. 8.1.).

Bevor die Materialien für heterogene Hybridisierungsreaktionen in 2.4 M TEACl eingesetzt wurden, erfolgte eine 2-tägige Präinkubation bei 45°C in diesem Medium, um die nicht stabil gekuppelte DNA freizusetzen. Je nach Kupplungsverfahren wurden dabei ca. 30 - 50% der ursprünglich immobilisierten DNA freigesetzt. Danach betrug die Verlustrate unter diesen Bedingungen nur noch etwa 1% pro Tag, wie sich durch Kontrollmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (Nuclease-Verdauung) feststellen ließ.

9. DNA-Fraktionierung

9.1. Fraktionierung über Hydroxylapatit

Die DNA aus D. hydei-Männchen und -Weibchen wurde über Hydroxylapatit (HAP) nach Komplexitätsklassen vorfraktioniert (Britten und Kohne, 1968).

9.1.1. Fraktionierung der Gesamt-DNA in repetitive und "unique"-Sequenzen

Für eine Menge von 1 mg adsorbierter DNA wurden 2 g HAP-Pulver (BIO-RAD, DNA-grade Bio-Gel HTP) in 20 - 30 ml 0.3 M Na-Phosphat, pH 6.8 suspendiert und für 10 min bei 80°C inkubiert. Nach dem Absetzen der HAP-Partikel (15 min, Zimmertemperatur) wurde der Überstand dekantiert und das Sediment vorsichtig in 0.3 M Na-Phosphat, pH 6.8 resuspendiert. Die Suspension wurde in eine 65°C thermostatierte Glassäule von Serva (Innendurchmesser: 1,5 cm), ausgerüstet mit einem "Flow"-Adapter, gefüllt. Nach dem Absetzen des Materials und der Äquilibrierung mit 0.12 M Na-Phosphat, pH 6.8 war die Säule für die DNA-Fraktionierung verwendungsfähig.

Abweichend von dem sonst üblichen Medium, 0.12 M Na-Phosphat, erfolgte die Renaturierung der beschallten und zuvor für 5 min bei 70°C denaturierten Fliegen-DNA in 2.4 M TEACl, pH 7.5 bei 45°C. In diesem Medium ist die thermische Stabilität der DNA nicht von der Basenzusammensetzung beeinflußt, so daß die Renaturierungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten von dem GC-Gehalt (Melchior und Hippel, 1973) unabhängig ist.

Um die Renaturierungsreaktion bei dem gewünschten $C_o t$-Wert abzubrechen, wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gesetzt. Durch Gelfiltration in einer mit 0.12 M Na-Phosphat, pH 6.8 äquilibrierten Sephadex G-100 Säule wurde die DNA in den für die

HAP-Fraktionierung notwendigen Phosphat-Puffer überführt. Die DNA wurde dann schrittweise auf die 65°C thermostatierte HAP-Säule gegeben, durch welche sie mit einer Varioperpex-Punpe von LKB mit einer Fließrate von 30 ml/h hindurchgepumpt wurde. Um die nicht adsorbierte Einzelstrang-DNA zu eluieren, wurde mit 0.12 M Na-Phosphat so lange nachgespült, bis die Absorption bei 260 nm < 0.05 war. Anschließend erfolgte die Elution der adsorbierten doppelsträngigen DNA mit 0.3 M Na-Phosphat, pH 6.8. Die einzelsträngige, nicht adsorbierte und in 0.12 M Na-Phosphat befindliche DNA wurde, nach der Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm, gegen 0.005 M Tris-HCl, pH 8.0 dialysiert, anschließend mit sekundärem Butanol bis auf ein Volumen von etwa 2 ml eingeengt und gefällt.

Durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit wurde für die Fraktion der mit 0.3 M Na-Phosphat eluierten DNA anhand einer Eichskala die Phosphatkonzentration im Eluat bestimmt. Für die weitere Auftrennung dieser repetitiven DNA wurde das Eluat soweit mit Wasser verdünnt, bis die hierfür notwendige Konzentration von 0.12 M Na-Phosphat erreicht war.

9.1.2. Trennung der repetitiven DNA in hoch- und mittelrepetitive Sequenzen

Die Fraktionierung repetitiver DNA erfolgte bei entsprechend niedrigen $C_o t$-Werten im Bereich von $C_o t$ = 0.01. Für eine möglichst genaue Einhaltung der damit verbundenen, relativ engen Zeitintervalle (2 - 4 min) bei den verwendeten DNA-Konzentrationen (10 - 20 µg/ml) wurde die Fraktionierung gemäß des in Abb. 1 schematisch dargestellten Versuchsaufbaus durchgeführt. Zwei thermostatierbare Glassäulen (Innendurchmesser: 0.6 cm) wurden über zwei dazu passende und durch ein Teflon-Schlauchstück aneinandergekuppelte Adapter-Köpfe miteinander verbunden. In der unteren Säule befand sich das HAP-Bett, die obere diente als Reservoir für die zu fraktionierende DNA, welche

in O.12 M Na-Phosphat, pH 6.8 gelöst war. Aus dem zur Denaturierung der DNA auf 98°C thermostatierten Reservoir wurde die Lösung über den Verbindungsstutzen mit Hilfe einer Varioperpex-Pumpe von LKB direkt in das HAP-Bett der unteren Säule gepumpt. Die untere Säule war auf 65°C thermostatiert, so daß die Renaturierung der DNA nur innerhalb des Ausschlußvolumens des HAP-Gels erfolgen konnte. Bei gegebener DNA-Kon-

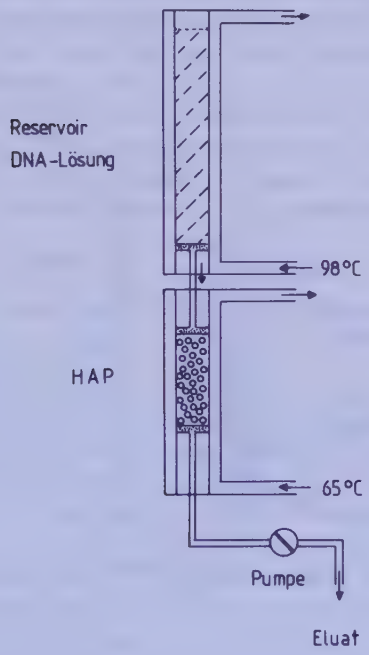


Abb. 1: Fraktionierung von repetitiver DNA über Hydroxylapatit (HAP). Erläuterung s. Text.

zentration war die Reaktionsdauer und damit der $C_o t$-Wert für die Fraktionierung vorgegeben durch die Zeit, welche die DNA zum Passieren der HAP-Säule zur Verfügung hatte. Somit konnte bei bekanntem Ausschlußvolumen der HAP-Säule von ca. 75% des Bettvolumens (BIO-RAD, 1981) der $C_o t$-Wert zur Abtrennung hochrepetitiver DNA über die Flußrate eingestellt werden.

9.2. Fraktionierung über heterogene DNA/DNA-Hybridisierung

Das Verfahren der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung (Bünemann, 1982) wurde für die Reinigung der über HAP vorfraktio-

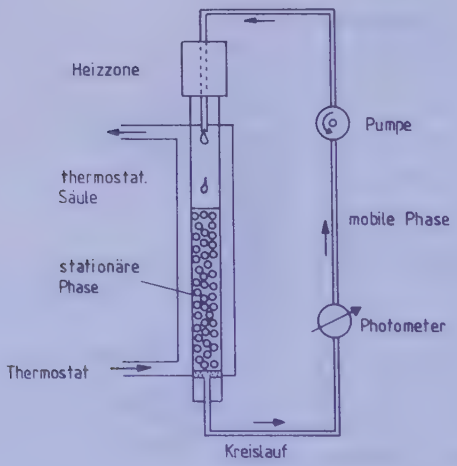


Abb. 2: Schematische Darstellung der Fraktionierung über heterogene DNA/DNA-Hybridisierung.
Schema: H. Bünemann

nierten DNA und für die Anreicherung Y-spezifischer DNA-Sequenzen aus D. hydei eingesetzt. In Abb. 2 ist das Verfahren schematisch dargestellt. In einem geschlossenen und mit einer peristaltischen Pumpe getriebenen Kreislauf wurde die über HAP vorfraktionierte DNA (mobile Phase) in 2.4 M TEACl kontinuierlich durch eine auf 45°C thermostatierte Säule mit immobilisierter DNA der gleichen Komplexitätsklasse (stationäre Phase) gepumpt. Unmittelbar vor Eintritt in die Säule wurde die zirkulierende DNA durch Passieren einer auf 90°C erhitzten Schlaufe eines Teflon-Schlauches denaturiert. Der Reaktionsverlauf wurde entweder durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Durchflußküvette mit einem PM2 DL Photometer (Zeiss) verfolgt, oder über die Abnahme der Radioaktivität im Kreislauf, indem zu verschiedenen Zeitpunkten ein Aliquot (5 - 10 µl) der ^{3}H-markierten, zirkulierenden DNA für die Radioaktivitätsbestimmung entnommen wurde. Das Gesamtvolumen des Kreislaufes betrug durchschnittlich 1.5 ml.

10. "Screening" einer Lambda-Phagen-Bibliothek des D. hydei-Genoms

Die Isolierung spezifischer DNA-Sequenzen erfolgte durch "Screening" (Benton und Davis, 1977), einer von H. Bünemann mit dem Restriktionsenzym Sau 3A hergestellten Lambda EMBL 3-Bibliothek des D. hydei-Männchen-Genoms. Diese Bibliothek hat einen Umfang von 150 000 Klonen und die "Insert"-Länge pro Klon beträgt durchschnittlich 14.2 kb (Durchschnittswert von 10 Klonen). Die Wahrscheinlichkeit, mit der jede Sequenz des Genoms in der Bibliothek enthalten ist, kann nach der Formel von Clarke und Carbon (1976) wie folgt berechnet werden:

$$N = \frac{\ln (1-P)}{\ln (1-f)}$$

wobei P die gewünschte Wahrscheinlichkeit, f der Bruchteil des Genoms in einer Rekombinante, und N die notwendige An-

zahl von Rekombinanten ist. Bei einer Größe des D. hydei-Männchen-Genoms von 4.57 x 10^8 bp (Zacharias et al., 1982) wären theoretisch 148 206 Klone erforderlich, um das Genom mit 99%iger Wahrscheinlichkeit vollständig zu repräsentieren.

Die rekombinanten Phagen wurden in 2 - 3 ml SM-Puffer unter Zusatz eines Tropfens Chloroform bei 4°C gelagert. Die Amplifizierung erfolgte im E. coli-Stamm K 802 in einer Schicht aus LB-Topagarose. Für das "Screening" von 10000 amplifizierten Phagen-Klonen (Phagen-Plaques) wurden 10 µl der Ausgangssuspension (Phagentiter: 10^6/ml) mit 0.6 ml einer E. coli K 802-Suspension (s. II. 4) und 0.6 ml SM-Puffer vermischt und zur Präadsorption der Phagen an die Zellen bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 7.5 ml geschmolzener, auf 45°C abgekühlter LB-Topagarose vermischt und in eine 13.5 cm Petrischale auf eine 0.4 cm hohe Schicht von LB-Agarose ausgegossen. Nach dem Festwerden der Topagarose wurde die Platte invertiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vor dem Transfer der Phagen auf Nitrocellulose-Rundfilter von Millipore (13.5 cm Durchmesser, 0.45 µm Porengröße) wurde die Agaroseschicht für ca. 30 min bei 4°C gehärtet. Nacheinander wurden sechs feucht sterilisierte, trockene Filter luftblasenfrei auf die mit Phagen-Plaques durchsetzte Schicht aus Topagarose gelegt. Zur Adsorption der Phagen wurden die Filter bis zum vollständigen Durchfeuchten für 1 - 4 min auf der Topagarose belassen und anschließend vorsichtig mit einer Pinzette abgezogen. Die Punktmarkierung der Filter mit chinesischer Tinte (Pelikan) erfolgte zur späteren Orientierung anhand dreier, asymmetrisch angeordneter Löcher in der Agaroseschicht, die zuvor mit einer Pasteur-Pipette ausgestanzt wurden. Zwischendurch, nach dem Abziehen des 3. Filters, wurde die Phagenplatte durch Überstülpen mit einer offenen, frischen LB-Agarose-Petrischale rückgefeuchtet. Dazu wurde die Kontaktzone beider Schalen an den Kanten mit Parafilm versiegelt, die so miteinander verbundenen Schalen invertiert und für 10 - 20 min bei 4°C inkubiert.

Um die DNA der adsorbierten Phagen zu denaturieren, wurden die Filter für 2 - 4 min in eine Lösung von 0.4 M NaOH, 0.8 M NaCl gelegt. Nach der Neutralisierung in einer Lösung von 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5, für ebenfalls 2 - 4 min wurden sie für zweimal 5 min in 2 x SSC gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA-Fixierung erfolgte in einem Vakuumschrank bei 80°C.

Die Hybridisierung mit ^{32}P-markierten DNA-Proben erfolgte wie unter II. 14. angegeben. Phagen-Plaques, die nach der Hybridisierung auf dem Autoradiogramm ein Signal verursachten, wurden mit dem oberen Ende einer sterilen Pasteur-Pipette ausgestanzt und mit einem kleinen Rundspatel ausgehebert. Die Agaroseschеibchen, die wegen des hohen Phagentiters in der Impfsuspension neben den gesuchten noch 5 - 10 weitere Plaques enthielten, wurden in 1 ml SM-Puffer überführt und zum Herausdiffundieren der Phagen für 4 - 6 h bei 4°C inkubiert. Um die Phagentiter zu bestimmen, wurde von jedem Ansatz auf einer Titerplatte eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem Aliquots von 10 µl, 5 µl und 2 µl mit je 100 µl SM-Puffer gemischt wurden (1:10, 1:20, 1:50). Von jeder Verdünnungsstufe wurden 10 µl in einen 1/4 Sektor einer 8.5 cm Petrischale pipettiert, deren LB-Agarose zuvor mit einer Mischung aus 0.2 ml SM-Puffer, 0.2 ml E. coli K 802 Suspension und 2.5 ml LB-Topagarose überschichtet wurde. Nach der Inkubation bei 37°C für 8 - 10 h konnten über die Anzahl der Phagen-Plaques pro Sektor die Titer bestimmt werden.

Zur Vereinzelung der 5 - 10 verschiedenen Phagen-Klone in jedem Ansatz wurden "Subcreens" auf 8.5 cm Petrischalen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 0.2 ml SM-Puffer mit einem Phagentiter von 50 - 100 mit 0.2 ml E. coli K 802-Suspension gemischt, bei 37°C für 30 min präinkubiert und nach Zugabe von 2.5 ml geschmolzener LB-Topagarose in die Petrischalen über die feste LB-Agarose ausgegossen. Der weitere Ablauf der Phagenamplifikation und der Replica-Herstellung mit 8.5 cm Filtern erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Verfahren für 13.5 cm Filter.

Nach der Hybridisierung der Filter mit der entsprechenden ^{32}P-markierten DNA-Probe konnten den autoradiographischen Signalen einzelne Plaques zugeordnet werden. Diese wurden mit einer sterilisierten Pasteur-Pipette ausgestochen und in 0.2 ml SM-Puffer bei 4°C für 4 - 6 h eluiert. Die so erhaltenen Phagensuspensionen der einzelnen Klone wurden unter Zusatz von 5 µl Chloroform bei 4°C gelagert.

11. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Proben

Die radioaktive Markierung von DNA mit Tritium oder ^{32}P erfolgte durch Nick-Translation mit der DNA-Polymerase I (klonierte DNA) oder durch Auffüllen von Einzelstrangenden kurzer, renaturierter DNA-Moleküle (ca. 500 bp) mit der grossen Untereinheit der DNA-Polymerase I. Dabei wurde entsprechend den im Institut modifizierten Methoden nach Maniatis et al. (1975) bzw. Macgregor und Mizuno (1976) verfahren.

11.1. "Nick"-Translation von klonierter DNA aus Lambda-Phagen

11.1.1. Tritium-Markierung zur Herstellung von DNA-Proben für in situ-Hybridisierungen

Je 50 - 100 pmol von ^{3}H-markierten dCTP, dGTP, dATP und dTTP von Amersham Buchler mit spezifischen Aktivitäten von 10 - 80 Ci/mmol wurden als Ammonium-Salze in Äthanol/Wasser (1:1) in einer Speed Vac-Zentrifuge unter Vakuum eingedampft. Anschliessend wurden für die "Nick"-Translation folgende Mengen eingesetzt: 0.2 µg klonierter DNA (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0), 1 µl 20 x Nick-Translationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M $MgCl_2$, 0.2 M 2-Mercaptoäthanol, Gelatine 1 mg/ml), 25 pg DNase I, 3 Einheiten DNA-Polymerase I. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt und bei 15°C für 2 h inkubiert.

Zur Beendigung der Reaktion erfolgte unter Zusatz von 10 µl Tris/SDS-Puffer (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5% w/v SDS) eine Behandlung mit 0.5 µg Proteinase K für 30 min bei 37°C (Schwochau, Herrnstadt, persönliche Mitteilung). Im Anschluß daran wurden 200 µg (2000-fache Überschuß) beschallter und phenolisierter DNA aus Lachsspermien (Sigma) zugegeben und der gesamte Ansatz mit 1/10 Volumen 1 M NaOH für 5 min bei 80°C denaturierenden Bedingungen unterworfen. Die Neutralisierung erfolgte mit einer äquivalenten Menge an 1 M HCl.

Zur Abtrennung nicht eingebauter ^{3}H-Nucleotide wurde die DNA nach Zugabe von 4/5 Volumen 7.5 M Ammoniumacetat mit 2 Volumen Äthanol für 2 min bei -80°C (Äthanol/Trockeneis) gefällt. Nach dem Abzentrifugieren für 10 min in der Eppendorf-Zentrifuge wurde das Pellet zweimal mit 100 µl einer Lösung von 75% (v/v) Äthanol, 0.5% (w/v) Ammoniumacetat extrahiert (Zentrifugation für 2 min) und in 50 µl 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 gelöst. Abschließend wurde wie zuvor ein zweites Mal gefällt und das extrahierte und getrocknete Pellet in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst.

11.1.2. ^{32}P-Markierung zur Herstellung von DNA-Proben für Filterhybridisierungen

Für die Nick-Translation wurden 0.1 µg klonierter DNA und 3 - 8 pmol ^{32}P-dCTP von NEN mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol eingesetzt. In dem Reaktionsansatz waren weiterhin enthalten: 1 µl 20 x Nick-Translationspuffer (Zusammensetzung s. II. 11.1.1.), 25 pg DNase I, 3 Einheiten DNA-Polymerase I. Mit Wasser wurde auf das Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und für 2 h bei 15°C inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Ammoniumacetat/Äthanolfällung (s. II. 11.1.1.). Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer bei 65°C für 5 min gelöst.

11.2. Radioaktive Markierungen von renaturierter DNA

11.2.1. Tritium-Markierung

Um den Reaktionsverlauf bei der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung zuverlässig verfolgen zu können, wurde ein Aliquot (2.5 - 5.0 µg) der betreffenden, über HAP gewonnenen DNA-Fraktion nach der Renaturierung mit (methyl-^{3}H)-Thymidin-5'-triphosphat (^{3}H-dTTP) radioaktiv markiert. Auf den Einsatz von ^{3}H-markierten Vorstufen der drei anderen Desoxyribonucleotidtriphosphate wurde verzichtet, weil es im Rahmen der Vorversuche Hinweise darauf gegeben hatte, daß bei ihrer Verwendung die Markierung der DNA-Probe während der Reaktion in 2.4 M TEACl nicht stabil ist.

Für das Auffüllen der überstehenden 5'-Einzelstrangenden beschallter, renaturierter DNA mit den vier Desoxyribonucleotiden wurde die große Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) verwendet.

Für die Reaktion wurden je nach DNA-Menge (2.5 - 5.0 µg) 50 - 100 pmol ^{3}H-dTTP mit einer spezifischen Aktivität von 30 - 80 Ci/mmol als Ammoniumsalz in Äthanol/Wasser (1:1) in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Der Reaktionsansatz enthielt weiterhin 4 µl 5 x Polymerase-Puffer (0.25 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.05 M $MgCl_2$) je 1 - 2 µg unmarkierter dGTP, dATP und dCTP, 1 µl 0.01 M DTE und 4 - 6 Einheiten DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment.

Die Beendigung der Reaktion durch Proteinase K und die weitere Behandlung der Probe erfolgte wie unter II. 11.1.1. angegeben, nur mit dem Unterschied, daß zur Fällung keine Fremd-DNA zugesetzt wurde, da diese während der Anreicherungsversuche gestört hätte.

Zum Einsatz für *in situ*-Hybridisierungen entsprechender DNA-Fraktionen wurden für die Markierung alle vier Desoxyribonucleotidtriphosphate in ^{3}H-markierter Form angeboten. Um die

notwendige, höhere spezifische Aktivität zu erreichen, wurden dabei unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen nur 0.1 - 0.2 µg renaturierter DNA eingesetzt.

11.2.2. ^{32}P-Markierung

Zum Einsatz für Filterhybridisierungen erfolgte eine radioaktive Markierung von 0.1 µg renaturierter DNA mit 3 - 8 pmol ^{32}P-dCTP (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol) bei Reaktionsbedingungen wie unter II. 11.2.1. angegeben. Nach Abschluß der Reaktion wurde eine Ammoniumacetat/Äthanol-Fällung unter Zusatz von 25 µg unmarkierter DNA aus Lachsspermien durchgeführt.

12. Szintillationszählung

Die Ermittlung der relativen Radioaktivitätsmengen von DNA-Proben aus einer Meßreihe erfolgte durch Bestimmung der cpm-Werte im Flüssigkeits-Szintillationszähler von Packard (Typ 3380 oder Tri-Carb 4530). Die standardisierten Szintillationscocktails enthielten 1 ml Wasser mit einem Aliquot der DNA-Probe (1 - 10 µl) in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Insta-Gel II von Packard).

13. Restriktionsanalyse von DNA und Transfer auf Nitrocellulose-Filter

13.1. Verdauung durch Restriktionsenzyme

Ein einzelner Reaktionsansatz enthielt 0.5 - 2.0 µg DNA unter Zusatz von 2 - 6 Einheiten des betreffenden Restriktionsenzyms in dem dafür angegebenen Medium (Tab. 1). Das Endvolumen der Reaktionsansätze betrug 20 µl. die Reaktionszeit 2 - 3 h bei 37°C. Für Taq I erfolgte die Reaktion bei 65°C. Die Re-

Restriktions-enzym	Tris-HCl (mmol)	NaCl (mmol)	$MgCl_2$ (mmol)	DTE (mmol)	2-Mercapto-äthanol (mmol)	BSA µg/ml	pH
Alu I	6	50	6	10	-	-	7.6
Bam HI	50	50	10	1	-	-	8.0
Eco RI	10	50	10	-	-	-	7.5
Hae III	6	6	6	-	6	100	7.4
Hha I	6	6	6	-	6	100	7.4
Hind III	10	50	10	14	-	-	7.6
Hpa II	10	-	10	1	-	-	7.5
Pst I	50	50	10	-	-	-	8.0
Sal I	6	125	6	-	7	-	8.2
Sau 3A	6	50	6	-	-	100	7.5
Taq I	6	100	6	-	6	-	7.4

Tab. 1: Zusammensetzung der Reaktionsmedien für Restriktionsenzyme

aktion wurde beendet durch Zugabe von 4 µl einer Lösung der folgenden Zusammensetzung: 50% w/w Saccharose, 2% w/w Bromphenolblau, 0.001 M EDTA.

13.2. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in horizontalen 0.8 - 1.2%igen Agarose-Gelen in Elektrophoresepuffer (0.04 M Tris-Acetat, pH 7.8, 0.001 M EDTA) bei einer Spannung von 2 - 3 V/cm für ca. 14 h; dabei war das 0.4 cm hohe Gel mit einer 0.3 - 0.5 cm hohen Schicht von Elektrophoresepuffer bedeckt. Die Probekammern waren 1 cm lang und 0.1 cm breit.

Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) in Elektrophoresepuffer für ca. 30 min gefärbt und im UV-Durchlicht auf einem Transilluminator unter Verwendung eines Rotfilters mit einem Polaroid-Film 665 photographiert. Die Belichtungszeit betrug 1 - 2 min bei Blende 5.6.

13.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolierung einzelner DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen erfolgte nach der "Freeze-Squeeze"-Methode (Thuring et al., 1975). 10 µg klonierter DNA wurden mit dem betreffenden Restriktionsenzym, wie unter II. 13.2. angegeben, in einem entsprechend größerem Reaktionsvolumen von 100 - 200 µl verdaut und in einem präparativen Gel mit 5 cm langen und 0.1 cm breiten Probekammern aufgetrennt. Nach dem Anfärben mit Ethidiumbromid wurde der Gelstreifen, welcher das fragliche Restriktionsfragment enthielt, im UV-Durchlicht mit der Rasierklinge ausgeschnitten.

Der ausgeschnittene Gelstreifen wurde in eine 5 cm^3-Spritze überführt und bei -20°C tiefgefroren. Die DNA-haltige Flüssigkeit wurde aus dem gefrorenen Gelstück gewonnen, indem es während des Auftauens in der Kaltkammer bei 4°C mit dem

Stempel der Spritze ausgepreßt wurde. Das Eluat wurde phenolisiert und mit Äthanol gefällt.

13.4. Transfer auf Nitrocellulose-Filter

Der Transfer der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen auf Nitrocellulose-Filter wurde modifiziert nach Southern (1975) durchgeführt.

Nach dem Anfärben und Photographieren wurde das Gel für jeweils 30 min mit einer Denaturierungslösung (0.25 M NaOH, 0.6 M NaCl) und anschließend mit einer Neutralisierungslösung (0.5 M Tris-HCl, pH 7.0, 1.5 M NaCl) behandelt. Der Transfer auf ein Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll, Porengröße: 0.45 µm) erfolgte mit 20 x SSC über Nacht bei Zimmertemperatur. Nach der Wäsche in 2 x SSC für 10 min wurde das Filter luftgetrocknet und zur Fixierung der DNA für 2 h in einen Vakuumschrank bei 80°C gelegt.

14. DNA/DNA-Filterhybridisierung - Autoradiographie

Vor der Hybridisierung wurden die Filter für 4 h bei 62 - 65°C vorinkubiert in 50 - 100 ml 2 x SSC, 0.2% (w/v) SDS, 1 x Denhardt-Medium und Lachsspermien-DNA, 10 µg/ml. Die Hybridisierung mit 0.05 - 0.1 µg ^{32}P-markierter DNA erfolgte in 3 - 10 ml des gleichen Mediums. Die DNA wurde zuvor im Hybridisierungsmedium durch Hitze denaturiert (5 min, 100°C, anschließend auf Eis). Die Hybridisierungsdauer betrug 14 - 20 h bei 62 - 65°C. Anschließend wurden die Filter bei der gleichen Temperatur in 50 - 100 ml 2 SSC, 0.2% (w/v) SDS für 2 - 3 h mit vier- bis fünfmaligem Wechsel der Waschlösung gewaschen.

Die luftgetrockneten Filter wurden zur Autoradiographie mit einem Kodak X-Omat Röntgenfilm belegt. Bei geringer spezifischer Aktivität der DNA-Probe, sowie geringer Menge an fixier-

ter DNA, wurden zur Verstärkung der Signale Screens von Du Pont eingesetzt. Die Exposition wurde dann bei -80°C durchgeführt.

15. Quantifizierung autoradiographischer Signale

Die Bestimmung von Radioaktivitätsmengen über die Intensität autoradiographischer Signale erfolgte densitometrisch im Joyce-Loebl Chromoscan. Signale aus dem linearen Schwärzungsbereich wurden im sichtbaren Licht bei 540 nm vermessen und aufgezeichnet. Zur Quantifizierung wurden die Flächen unter den Absorptionsmaxima ausgeschnitten und gewogen.

16. In situ-Hybridisierungen an Metaphase-Chromosomen

16.1. Herstellung von Mitose-Präparaten

Die Herstellung von Mitose-Präparaten erfolgte mit Abänderungen nach Holmquist (1975) aus Neuroblasten des 3. Larvenstadiums. Dazu wurden etwa 10 Ganglien mit dem dorsalen und ventralen Teil zusammenhängend in Drosophila-Ringer präpariert und in 1 ml SSM-Zellkulturmedium gesammelt. Zur Arretierung der Metaphasen erfolgte eine Behandlung mit 0.7 µg Colcemid (Stammlösung in Wasser 100 µg/ml) pro ml Medium für 30 - 45 min bei Zimmertemperatur (Cobel-Geard und Gay, 1980). Nach Beendigung der Colcemid-Behandlung wurden die Ganglien in 1 ml einer hypotonischen 1%igen Natriumcitrat-Lösung überführt, um sie für 10 min schwellen zu lassen. Die anschliessende Fixierung der Ganglien erfolgte in frisch angesetztem Methanol/Eisessig (3:1) für 3 x 10 min. Sodann wurden die einzelnen Ganglien jeweils in einem Tropfen 60%iger Essigsäure auf 50°C (Wärmeplatte) temperierte Objektträger gegeben; die Objektträger wurden zuvor mit Hilfe eines Kleenex-Tuches und eines Spritzers Äthanol gereinigt. Nach etwa 30 sec

wurden die dissoziierenden Zellen durch gelegentliches, langsames Hin- und Herschwenken des Objektträgers auf seiner Oberfläche verteilt. Zum Schluß wurde mit einem Spritzer Methanol/Eisessig (3:1) nachfixiert.

16.2. Vorbehandlung der Präparate

Die Präparate wurden zunächst einer Hitzebehandlung bei 70°C in 2 x SSC für 30 min nach Bonner und Pardue (1976) unterzogen und anschließend mit Äthanol entwässert (Standard-Entwässerung: 70% Äthanol für 2 x 10 min und 95% Äthanol für 1 x 5 min). Danach wurden die Objektträger in 30 ml einer Lösung von 100 µg RNase A pro 1 ml 2 x SSC bei 37°C für 2 h inkubiert (Pardue und Gall, 1975), nachfolgend für 2 x 5 min mit 2 x SSC bei Zimmertemperatur gewaschen und wieder mit Ähtanol entwässert.

Zur Acetylierung basischer Gruppen nach Hayashi et al. (1978) erfolgte eine 10-minütige Inkubation (Zimmertemperatur) in 200 ml 0.1 M Triäthanolamin, pH 8.0 (HCl) mit einem Zusatz von 0.5 ml Essigsäureanhydrid. Anschließend folgte eine Wäsche in 2 x SSC für 2 x 5 min und die Standard-Entwässerung. Um die DNA zu denaturieren, wurden die Objektträger für 3 min in 0.07 M NaOH (Raumtemperatur) getaucht und anschließend in 70% Äthanol für 1 x 10 min, 70% Äthanol für 2 x 5 min und 95% Äthanol für 1 x 5 min entwässert.

16.3. Hybridisierung an Metaphase-Chromosomen

Die Hybridisierung mit der Tritium-markierten DNA-Probe (spezifische Aktivität: ca. 5×10^6 cpm/µg) erfolgte nach Macgregor und Mizuno (1976) in 4 x SSC, 50% (v/v) Formamid bei 37°C für 12 bis 16 h. Das verwendete Formamid (Merck) wurde über ein Ionenaustauscherharz (BIO-RAD, AG 501-X8, 20 - 50 mesh) soweit deionisiert, bis die Leitfähigkeit auf 20 µS reduziert war und in 100 ml Portionen bei -20°C gelagert.

Die DNA-Probe wurde wie folgt hergestellt: 0.1 µg Tritium-markierter DNA wurden im Anschluß an die Nick-Translation mit einem 2000-fachen Überschuß an unmarkierter DNA aus Lachsspermien gefällt, in 10 µl H_2O bei 80 - 100°C für 5 min gelöst, auf Eis mit 1 µl 1 M NaOH denaturiert und mit H_2O auf ein Volumen von 14 µl aufgefüllt. Die Neutralisierung erfolgte mit 36 µl einer Lösung folgender Zusammensetzung: 1 µl 1 M HCl, 25 µl Formamid, 10 µl 20 x SSC. Auf diese Weise wurden die Endkonzentrationen von 4 x SSC und 50% (v/v) Formamid erzielt.

Auf jeden Objektträger wurden 8 - 10 µl (80000 - 100000 cpm) gegeben und mit einem für 5 min in 0.1 M HCl gekochten, mit destilliertem Wasser gespülten und luftgetrockneten Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Zur Hybridisierungsreaktion bei 37°C wurden die Objektträger in eine mit Parafilm versiegelte Petrischale auf ca. 3 mm hohen Glasstegen positioniert. Auf dem Boden der Petrischale, zwischen den Glasstegen, befanden sich Filterpapierstreifen, die mit dem Hybridisierungsmedium getränkt waren. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Deckgläser in 2 X SSC bei Raumtemperatur abgespült und die Präparate den folgenden Waschzyklen in 2 x SSC unterworfen: 3 x 5 min bei Raumtemperatur, 3 x 5 min bei 60°C, 1 x 5 min bei Raumtemperatur mit anschließender Standard-Entwässerung.

16.4. Autoradiographie und Färbung

Zur Autoradiographie erfolgte eine Beschichtung mit Photoemulsion (Kodak NTB 2, 1:1 verdünnt) bei 45°C nach Pardue und Gall (1975). Nach dem Trocknen des Films wurden die Objektträger für ca. 5 sec in eine Wasserstoffperoxid-Gas enthaltende Atmosphäre getaucht, um die Anzahl der "Background"-Silberkörner zu reduzieren. Die Entwicklung nach der Exposition bei 4°C erfolgte in Kodak D-19 (1:1 verdünnt) für 2.5 min bei 16°C. Anschließend wurden die Objektträger kurz in Wasser getaucht, in Agfa Acidofix für 5 min fixiert, danach für

5 x 2 min in destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Präparate wurden nach Pardue und Gall (1975) in 5% (v/v) Giemsa-Gurr von Hopkin & Williams in O.O1 M Na-Phosphat, pH 6.8 für 30 min gefärbt, kurz in destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet.

III. ANREICHERUNG Y-SPEZIFISCHER DNA-SEQUENZEN AUS D. HYDEI - ERGEBNISSE

1. Einführung in die Problematik

Die Methode der "erschöpfenden" heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung (Bünemann, 1982) wurde entwickelt, um chromosomenspezifische DNA stark anzureichern. Das Prinzip des Verfahrens besteht in einer möglichst vollständigen Hybridisierung der DNA zweier Genome, welche sich nur durch den Besitz, bzw. Nichtbesitz eines einzelnen, definierten Chromosoms oder Chromosomenfragments voneinander unterscheiden. Dazu wird die DNA, welche die gesuchten, chromosomenspezifischen Sequenzen enthält (mobile Phase), mit einem Überschuß der immobilisierten, homologen, aber hinsichtlich dieser Sequenzen defizienten DNA (immobile Phase) in einem geschlosenen Kreislaufsystem kontinuierlich zur Reaktion gebracht (s. Abb. 2). Auf diese Weise erfolgt innerhalb der zirkulierenden DNA eine starke Anreicherung der für das betreffende Chromosom spezifischen DNA, da sie keinen immobilisierten Reaktionspartner findet.

Eine derartige Anreicherung chromosomenspezifischer DNA-Sequenzen über das Verfahren der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung wird durch den Einsatz von DNA-Fraktionen möglichst einheitlicher Komplexität erheblich erleichtert. Ein wesentlicher Grund hierfür ist das für verschieden komplexe DNA-Komponenten unterschiedliche Auflösungsvermögen hinsichtlich der Selektion spezifischer DNA-Sequenzen. Die mit zunehmender Komplexität verringerte Geschwindigkeit der Reaktionskinetik führt dazu, daß dann eine vollständige Hybridisierungsreaktion immer schwieriger zu erreichen ist. Damit wird auch der Grad der Anreicherung für eine hypothetische, spezifische Sequenz verringert.

Gegenüber einer DNA-Probe heterogener Komplexität erlaubt der Einsatz einheitlich komplexer DNA sowohl in der mobilen, wie in der immobilen Phase eine optimale Einstellung der Reaktionsparameter (z.B. der Konzentrationen von mobiler zu

immobilisierter DNA). Die Effizienz des Anreicherungsprozesses wird damit wesentlich gesteigert. Weiterhin wird eine Kontamination der angereicherten spezifischen DNA einer bestimmten Komplexität mit DNA-Komponenten anderer Komplexität weitgehend ausgeschlossen. Daraus resultiert eine erhebliche Vereinfachung bei der nachfolgenden Analyse der Fraktionen von angereicherter chromosomenspezifischer DNA.

Diese allgemeinen Überlegungen gelten auch für die Problematik der Anreicherung Y-spezifischer DNA-Sequenzen von D. hydei, wie die entsprechende Renaturierungskinetik veranschaulicht.

1.1. Komplexität des D. hydei-Genoms

Die Renaturierungskinetik von beschallter DNA aus D. hydei-Männchen in 2.4 M TEACl zeigt den für Eukaryonten-Genome typischen, dreiphasigen Verlauf (Abb. 3). Jede dieser Phasen repräsentiert eine unterschiedliche kinetische Komponente. Einer schnellen Komponente (hochrepetitiv, diese Komponente ist unter den gegebenen Konzentrationsbedingungen im Gilford-System nicht auflösbar) im $C_o t$-Bereich von $C_o t < 0.01$ ($\lg C_o t < -1$) folgt eine intermediäre Komponente (mittelrepetitiv), welche über etwa 2 Größenordnungen in der $C_o t$-Skala reassoziiert ($\lg C_o t -1 - \lg C_o t \sim 0.8$). Daran schließt sich eine langsame die "unique"-Sequenzen repräsentierende Komponente an ($\lg C_o t \sim 0.8 - \lg C_o t > 2.5$). Als Standard dient die Reassoziationskinetik von E. coli-DNA unter identischen Reaktionsbedingungen. Zur Ermittlung der Komplexität des D. hydei-Genoms wird der $C_o t1/2$-Wert des langsam reassoziierenden Anteils der D. hydei-DNA ("unique") mit dem $C_o t1/2$-Wert der E. coli-DNA in Relation gesetzt:

$$\frac{C_o t1/2 \text{ D. hydei-DNA ("unique")}}{C_o t1/2 \text{ E. coli-DNA}} = \frac{89,1}{2,8} = 32.$$

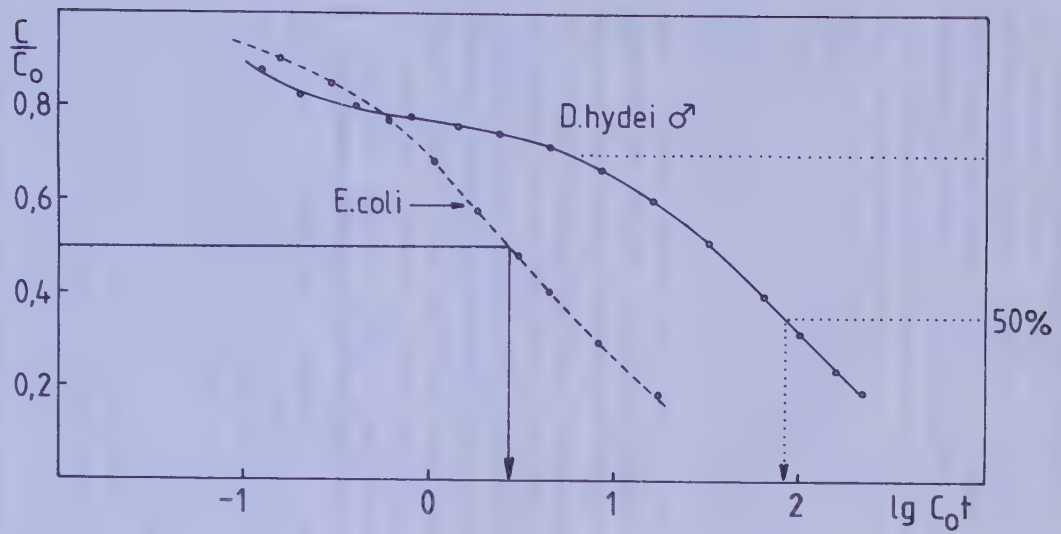


Abb. 3: Renaturierungskinetik von DNA aus D.hydei-Männchen bzw. E.coli in 2.4 M TEACl bei 45°C. Die obere punktierte Hilfslinie markiert in etwa die Grenze zwischen den verschiedenen repetitiven und den singulären Sequenzen der D.hydei-DNA. Die senkrechten Pfeile auf der Abszisse markieren die lg $C_o t$ 1/2-Werte; für D.hydei wird dabei nur die "unique"-Komponente berücksichtigt. C = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) im Verlauf der Reaktion; C_o = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) vor Reaktionsbeginn; t = Zeit (sec).

Demnach ist die Komplexität des D. hydei-Genoms im Vergleich zum E. coli-Genom etwa um den Faktor 32 größer. Setzt man die Komplexität des E. coli-Genoms gleich mit seiner Länge, $4.2 \cdot 10^6$ Basenpaare (Lewin, 1982), so beträgt die Größe des D. hydei-Genoms $1.34 \cdot 10^8$ Basenpaare. Dabei ist impliziert, daß im E. coli-Genom keine repetitiven Sequenzen enthalten sind.

Dieser Wert zeigt keine gute Übereinstimmung mit entsprechenden Literatur-Daten. So ergaben cytophotometrische Messungen $4.57 \cdot 10^8$ Basenpaare (Zacharias et al., 1982). Da beide Methoden mit vollständig unterschiedlichen Bezugsgenomen (E.coli bzw. Hühnererythrocyten) arbeiten, ist ein direkter Vergleich nicht möglich.

Die entsprechende Reassoziationskinetik von DNA aus Weibchen zeigt im wesentlichen denselben Verlauf.

Die $C_o t$-Analysen erfolgten in 2.4 M TEACl-Lösung, weil dieses Medium auch für die späteren DNA/DNA-Hybridisierungsreaktionen eingesetzt werden sollte. In diesem Medium hat die Basenzusammensetzung der DNA keinen Einfluß auf ihre thermische Stabilität. Daraus resultiert eine vom GC-Gehalt unabhängige Renaturierungsgeschwindigkeit (Melchior und Hippel, 1973). Dieser Sachverhalt war für den Anreicherungsprozeß von Bedeutung, da so der Gefahr einer selektiven Reaktion aufgrund eines stark vom Mittelwert abweichenden GC-Gehaltes bestimmter DNA-Sequenzen begegnet werden konnte. Ein weiterer Vorteil von 2.4 M TEACl als Reaktionsmedium für die Reassoziation von DNA ist die relativ niedrige Reaktionstemperatur. Sie ist um 15 - 20°C niedriger als für die sonst üblichen Reaktionsmedien (z.B. 0.12 M Na-Phosphat bzw. 2 x SSC). Damit wird die chemische Degradation der DNA insbesondere bei langen Reaktionszeiten für komplexe DNA ("unique") reduziert.

1.2. Schema zur Fraktionierung von D. hydei-DNA

Die aus den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse ließen es zweckmäßig erscheinen, nach dem in Schema 1 skizzierten Arbeitsplan vorzugehen. Dieser Plan sieht eine dreistufige Fraktionierung vor. Mit dem ersten Schritt erfolgt zunächst eine VORFRAKTIONIERUNG der DNA aus D. hydei-Männchen und -Weibchen über Hydroxylapatit (HAP). Dabei wird die Gesamt-DNA in die für Eukaryonten typischen Komplexitätsklassen: hochrepetitiv (HR-DNA), mittelrepetitiv (MR-DNA) und "unique" (U-DNA) getrennt. Die VORHYBRIDISIERUNG im zweiten Schritt erfolgt für jede der drei Fraktionen der DNA aus Männchen. Dabei wird die ^{3}H-markierte DNA aus Männchen mit immobilisierter Männchen-DNA gleicher Komplexität bei 45°C möglichst vollständig zur Reaktion gebracht. Die Vorhybridisierung soll sicherstellen, daß für den dritten Schritt, die ANREICHERUNGSHYBRIDISIERUNG, nur "hybridisierfähige" DNA (70°C-Eluat) eingesetzt wird. Die Anreicherung Y-spezifischer Sequenzen soll durch eine "erschöpfende" Hybridisierung dieser vorhybridisierten Männchen-DNA gegen immobilisierte Weibchen-DNA gleicher Komplexität erfolgen.

2. Vorfraktionierung der Gesamt-DNA über Hydroxylapatit

Der erste Fraktionierungsschritt hatte die Abtrennung von sogenannter "unique"-DNA von allen häufiger vorkommenden Sequenzen (repet. DNA) zum Ziel. Der Verlauf der Reassoziationskinetik von beschallter Gesamt-DNA aus D. hydei-Männchen in 2.4 M TEACl (Abb. 3) zeigt, daß diese Trennung am effektivsten bei $C_o t = 5.6$ ($\lg C_o t = 0.75$) erreicht werden sollte. Tatsächlich waren von der Gesamt-DNA bei $C_o t = 5.6$ 29% der DNA renaturiert und wurden von HAP zurückgehalten, in guter Übereinstimmung mit den theoretisch erwarteten 30% in Abb. 3.

Allerdings zeigen die $C_o t$-Analysen beider Fraktionen in Abb. 4, daß die "unique"-DNA noch ca. 10 - 15% an repetitiven

A N R E I C H E R U N G Y - S P E Z I F I S C H E R D N A

1. VORFRAKTIONIERUNG ÜBER HAP:

Fraktion

HR - DNA

MR - DNA

U - DNA

2. VORHYBRIDISIERUNG:

♂ immob./ ♂ mob. $\xrightarrow{45°C}$ verworfen

$\downarrow$ 70°C

3. ANREICHERUNGSHYBRIDISIERUNG:

♀ immob./ ♂ mob. $\xrightarrow{70°C}$ verworfen

$\downarrow$ 45°C

Y - ANGEREICHERTE DNA

Schema 1: Skizzierung der Anreicherung Y-spezifischer DNA.

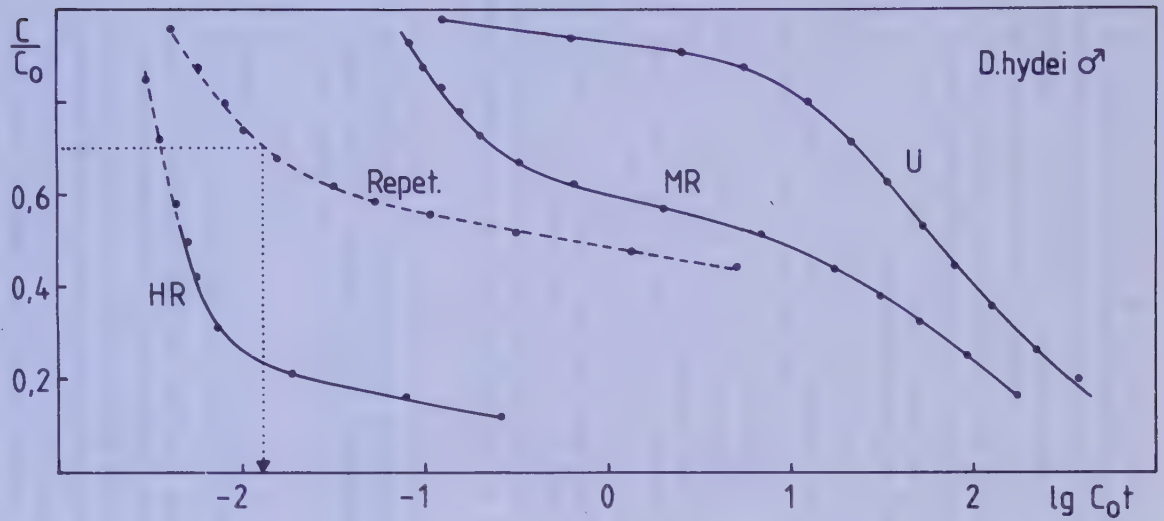


Abb. 4: Renaturierung von HAP-fraktionierter DNA aus D.hydei-Männchen in 2.4 M TEACl, 45°C bzw. in 0.12 M Na-Phosphat, pH 6.8, 65°C (Repet.). Der Pfeil auf der Abszisse markiert den C_ot-Wert für die Fraktionierung der repet. DNA. Der gestrichelte Kurvenverlauf für die HR-Fraktion zeigt die Renaturierung während der Abkühlphase in der Gilford-Schmelzküvette ausgehend von 70°C bis zum Erreichen der Reaktionstemperatur von 45°C. HR = hochrepetitive DNA; MR = mittelrepetitive DNA; U = "unique"-DNA. C = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) im Verlauf der Reaktion; C_o = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) vor Reaktionsbeginn; t° = Zeit (sec.).

Sequenzen enthält. Ebenso besteht die Fraktion der repet. DNA noch zu ca. 40% aus "unique"-Sequenzen. Aus dem Verlauf der Renaturierungskinetik der repet. DNA kann weiterhin ihre Zusammensetzung aus hochrepetitiven (HR) und mittelrepetitiven (MR) Sequenzen abgelesen werden, wie die punktierte Linie bei lg $C_o t$ = 1.9 in Abb. 4 zeigt. Durch Einstellung dieses $C_o t$-Wertes während einer modifizierten Fraktionierung über HAP (Abb. 1) sollten die hochrepetitiven Sequenzen von der mittelrepetitiven DNA getrennt werden.

Das Ergebnis der entsprechenden Fraktionierung wird wiederum durch die $C_o t$-Analysen verdeutlicht (Abb. 4). Beide Fraktionen zeigen deutlich unterschiedliche Kinetiken. So ist der $C_o t1/2$-Wert für die HR-DNA 0.01 (lg $C_o t$ < -2), während die DNA der MR-Fraktion über einen $C_o t$-Bereich von $< 0.1 - > 100$ (lg $C_o t < 1$ - lg $C_o t > 100$) reassoziiert. Stellt man in Rechnung, daß die Fraktion der HR-DNA etwa 35% der repet. DNA ausmacht, so beträgt ihr Anteil an der Gesamt-DNA etwa 10%.

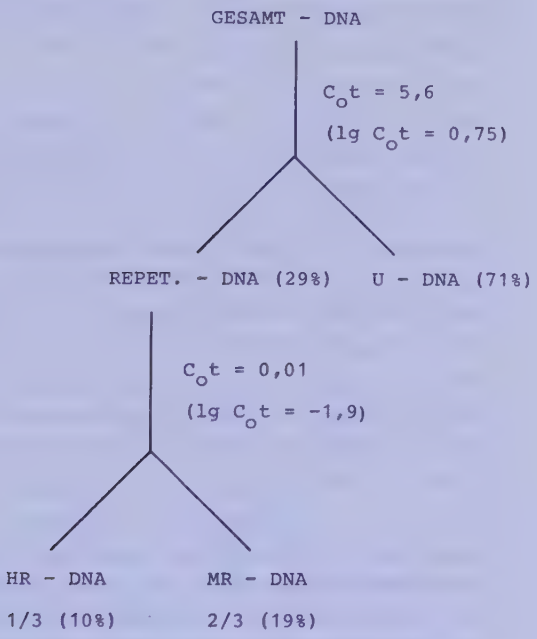
Die Fraktionierung der Gesamt-DNA aus Weibchen erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Fraktionierung der Männchen-DNA. Hinsichtlich der Anteile der entsprechenden Fraktionen (HR, MR, U) an der Gesamt DNA war kein Unterschied festzustellen.

Die Ergebnisse der Vorfraktionierung von D. hydei-DNA sind in Schema 2 zusammenfassend dargestellt. Auf die Fraktion der U-DNA entfallen demnach 71% der Gesamt-DNA; die repet. DNA (29%) spaltet sich in 10% HR-DNA und 19% MR-DNA auf.

3. Vorhybridisierung

Die Vorhybridisierung der über HAP nach Komplexitätsklassen vorfraktionierten DNA aus Männchen stellt gemäß Schema 1 den zweiten Schritt zur Anreicherung Y-spezifischer DNA dar. Zur Analyse der Reaktionsparameter wird ein Teil der DNA jeder Komplexitätsklasse (HR-, MR-, U-DNA) mit Tritium markiert, während der jeweils andere Teil immobilisiert wird.

VORFRAKTIONIERUNG VON D. HYDEI-DNA ÜBER HAP



Schema 2: Fraktionierung von D.hydei-DNA über Hydroxylapatit. Erläuterungen s. Text.

Die Tritium-markierte DNA wird dann kontinuierlich in einem geschlossenem Kreislauf mit der immobilisierten DNA gleicher Komplexität bei 45°C zur Reaktion gebracht (s. Abb. 2). Nach Abschluß der Reaktion erfolgt die Elution der hybridisierten DNA bei 70°C, welche nun für die Anreicherungshybridisierung (3. Schritt in Schema 1) zur Verfügung steht. Die Vorhybridisierung der Männchen-DNA hatte im wesentlichen zwei Ziele:

a) die Eliminierung nicht hybridisierfähiger DNA sowie kontaminierender ^{3}H-Nucleotide

   Für eine effektive Anreicherung Y-spezifischer DNA-Sequenzen durch die heterogene DNA/DNA-Hybridisierung ist die Abtrennung nicht hybridisierfähiger DNA unbedingt erforderlich. Sie würde durch das Anreicherungsverfahren zusammen mit Y-spezifischen DNA-Sequenzen in der mobilen Phase konzentriert. Weiterhin muß für eine genaue Analyse der Anreicherungshybridisierungsreaktion die spezifische Aktivität der tatsächlich hybridisierfähigen DNA bekannt sein.

b) Die Reinigung der über HAP erhaltenen DNA-Fraktionen von Sequenzen, welche nicht zur betreffenden Komplexitätsklasse gehören

   Die Kinetik 2. Ordnung für die heterogene DNA/DNA-Hybridisierung ist um eine Größenordnung langsamer als die entsprechende Renaturierung in freier Lösung (Bünemann, 1982). Die damit verbundene Streckung der Zeitskala erleichtert die Abtrennung bzw. Reinigung einheitlich komplexer DNA gegenüber der HAP-Fraktionierung für repetitive DNA. Dieser Sachverhalt kann für die Reinigung der MR-Fraktion von dem relativ hohen Anteil an "unique"-Sequenzen ausgenutzt werden.

Die Bedingungen für die Vorhybridisierungsversuche und deren Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt und werden im folgenden näher erläutert.

In Spalte 1 der Tabelle sind die über Hydroxylapatit gewonnenen DNA-Fraktionen (HR-, MR-, U-DNA) aufgeführt. Spalte 2

1	2	3	4	5	6	7
DNA-Fraktion	immob. DNA (µg/x g Feucht-masse)	mob. DNA (µg)	Anzahl der Ansätze	Reaktions-zeit (h)	% hybrid. DNA (70^{o}C-Eluat)	Gesamtmenge hybrid. DNA (µg)
HR-DNA	40/0.5 (DPTE S-500)	26	5	1	89	116
MR-DNA						
1. Durchgang	95/0.31 (DPTE S-500)	36	7	22	46	116
2. Durchgang (hybrid. DNA aus 1.)	95/0.31 (DPTE S-500)	18	4	8	87.5	63
U-DNA	200/0.83 (BrCN S-500)	125	10	72-96	50	625

Tabelle 2: Bedingungen und Ergebnisse der Vorhybridisierung (2.4 M TEACl, 45^{o}C) von HAP-vorfraktionierter DNA aus Männchen. Erläuterungen s.Text.

zeigt jeweils die für ein einzelnes Vorhybridisierungsexperiment an einen bestimmten Träger gekuppelte Menge an immobilisierter DNA. Während die HR- und die MR-DNA über das Diazotierungsverfahren (DPTE S-500) gekuppelt wurden, erfolgte die Immobilisierung der U-DNA über die Aktivierung des Trägermaterials mit BrCN (BrCN S-500). Der Vorteil der DNA-Immobilisierung über das hier verwendete BrCN-Verfahren (Arndt-Jovin, 1975) gegenüber dem Diazotierungsverfahren (Seed, 1982) besteht in einer, etwa um den Faktor 1.5 - 2 schnelleren Kinetik (2. Ordnung) bei der Hybridbildung zwischen immobilisierter und mobiler DNA (Bünemann, 1982). Bei der Komplexität der U-DNA, deren vollständige Reassoziation $C_o t$-Werte >100 ($\lg C_o t > 2$, s. Abb. 3 und 4) erfordert, ist die so mögliche Halbierung der Reaktionszeit bedeutsam. Hingegen ist eine derartige Verkürzung der Reaktionszeit für die beiden repetitiven Komponenten HR- und MR-DNA, deren $C_o t$-Werte für die Reassoziierung um Größenordnungen niedriger liegen (s. Abb. 4) praktisch ohne Bedeutung. Deshalb erfolgte ihre Immobilisierung über das experimentell vergleichsweise störungsfreiere Diazotierungsverfahren.

Der Typ der Reaktionskinetik wird vom Verhältnis der Menge an immobilisierter DNA zur Menge an mobiler DNA bestimmt. Bei einem äquimolaren Mengenverhältnis erhält man eine Reaktionskinetik vom Typ 2. Ordnung, während bei einem vielfachen Überschuß an immobilisierter DNA die Reaktion annähernd als Kinetik 1. Ordnung verläuft. Für eine möglichst schnelle und vollständige Reaktion wären Konzentrationsverhältnisse für eine Kinetik 1. Ordnung erforderlich. Da die zur Verfügung stehende Menge an immobilisierter DNA der einzelnen Fraktionen jedoch relativ klein war, hätten zur Erreichung entsprechender Konzentrationsverhältnisse, absolut gesehen, nur sehr kleine Mengen an mobiler DNA eingesetzt werden können, deren Rückgewinnung für das Anreicherungsverfahren problematisch gewesen wäre. Weil es darauf ankam, eine möglichst große Menge an vorhybridisierter DNA zu erhalten, wurde pro Reaktionsansatz eine entsprechend große Menge mobiler DNA (Spalte 3) eingesetzt, so

daß der Überschuß an immobilisierter DNA nur ca. 1.5 - 5-fach (HR- bzw. MR-DNA, 2. Durchgang) war.

Bei einer gegebenen Menge an vorzuhybridisierender DNA hing die Anzahl der Reaktionsansätze (Spalte 4) daher von der Menge an immobilisierter DNA ab. So waren für die Vorhybridisierung der U-DNA insgesamt 10 Reaktionsansätze notwendig; im Zusammenhang mit der Reaktionszeit pro Ansatz von 72 - 96 h (Spalte 5) wird damit der speziell für diese Fraktion große zeitliche Aufwand der Vorhybridisierung deutlich.

In Spalte 6 der Tabelle 2 sind die Prozentsätze an hybridisierter, ^{3}H-markierter DNA am Reaktionsende für jede Fraktion angegeben. Diese DNA wurde aus dem 70°C-Eluat zurückgewonnen und nach der Überprüfung ihrer Komplexität durch eine $C_o t$-Analyse (Abb. 5) für die Anreicherungshybridisierung eingesetzt. Die relativen Anteile an hybridisierter DNA wurden durch die Bestimmung der Radioaktivitätsmengen in den 70°C-Eluaten im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangslösungen vor Reaktionsbeginn bestimmt. Zur Kontrolle diente die Radioaktivitätsbestimmung in den 45°C-Eluaten (nicht hybrid. DNA).

Interessanterweise waren von der über Hydroxylapatit gewonnenen Fraktion hochrepetitiver DNA aus Männchen 11% nicht gegen immobilisierte DNA aus der gleichen Fraktion hybridisierbar (89% hybrid. DNA, s. Spalte 6, Tab. 2). Eine Erklärung für dieses Verhalten gibt die $C_o t$-Analyse (Abb. 5) im Gilford-Spektralphotometer. Die Renaturierung dieser DNA erfolgt schneller als die Abkühlung der Küvette. Ihre Kinetik ist also im Gilford-System nicht auflösbar. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei dieser DNA um sog. "snap back"- oder "inverted repeat"- (IR-) Sequenzen. Die Bildung von DNA-Doppelstrangstrukturen durch"Hybridisierung" homologer, invers repetitiver Sequenzabschnitte im selben Einzelstrang entspricht einer intramolekularen Reaktion, die im Vergleich zu bimolekularen Reaktionen um Größenordnungen schneller und konzentrationsunabhängig verläuft. Damit wird die Hybridisierung an homologe, immobilisierte Sequenzen ausgeschlossen. Der Anteil solcher

eng benachbarter palindromischer Sequenzen am Gesamt-Genom würde sich nach den vorliegenden Ergebnissen auf etwa 1% belaufen.

Die Reassoziationskinetik der vorhybridisierten hochrepetitiven DNA (HR(v)) in Abb. 5 weist im Vergleich zur Kinetik der entsprechenden Ausgangsfraktion (HR, Abb. 4) keinen erkennbaren Unterschied auf.

Die Vorhybridisierung der MR-DNA (Abb. 4) erfolgte in zwei Durchgängen. Im ersten Durchgang konnten nach 22 h Reaktionszeit pro Ansatz nur 46% der DNA hybridisiert werden. Die Erklärung hierfür ist, daß in der Ausgangsfraktion ein beträchtlicher Anteil (40 - 50%) an "unique"-Sequenzen enthalten war. Die gewählten Reaktionsbedingungen waren für eine Hybridisierung dieser "unique"-Sequenzen (geringe Konzentration in der immobilen Phase und kurze Reaktionszeit im Vergleich zu den eigentlich erforderlichen $C_o t$-Werten, s. Abb. 4) sehr ungünstig. Durch die Tatsache, daß die Kinetik für die heterogene DNA/DNA-Hybridisierungsreaktion um eine Größenordnung langsamer verläuft als die Reaktionskinetik für die Hybridisierung in homogener Lösung (Bünemann, 1982), wird die selektive Hybridisierung mittelrepetitiver Sequenzen während der Vorhybridisierung zusätzlich begünstigt.

Um eine möglichst vollständige Abtrennung der "unique"-Sequenzen sicherzustellen, erfolgte für die im ersten Durchgang vorhybridisierte MR-DNA (70°C-Eluat) ein zweiter Durchgang zur Vorhybridisierung mit weiter verkürzter Reaktionszeit (8 h/22 h). Ein Anteil von jetzt 12.5% nicht hybridisierter DNA (87.5% hybrid. DNA) deutet darauf hin, daß mit dem ersten Durchgang offenbar tatsächlich nicht sämtliche "unique"-Sequenzen abgetrennt werden konnten.

Die Reassoziationskinetik der durch die zweistufige Vorhybridisierung gereinigten MR(v)-DNA (Abb. 5) weist im Gegensatz zur entsprechenden Ausgangsfraktion (MR, Abb. 4) auf eine relativ einheitliche Komplexität hin. Die MR(v)-DNA ist jetzt fast vollständig frei von "unique"-Sequenzen.

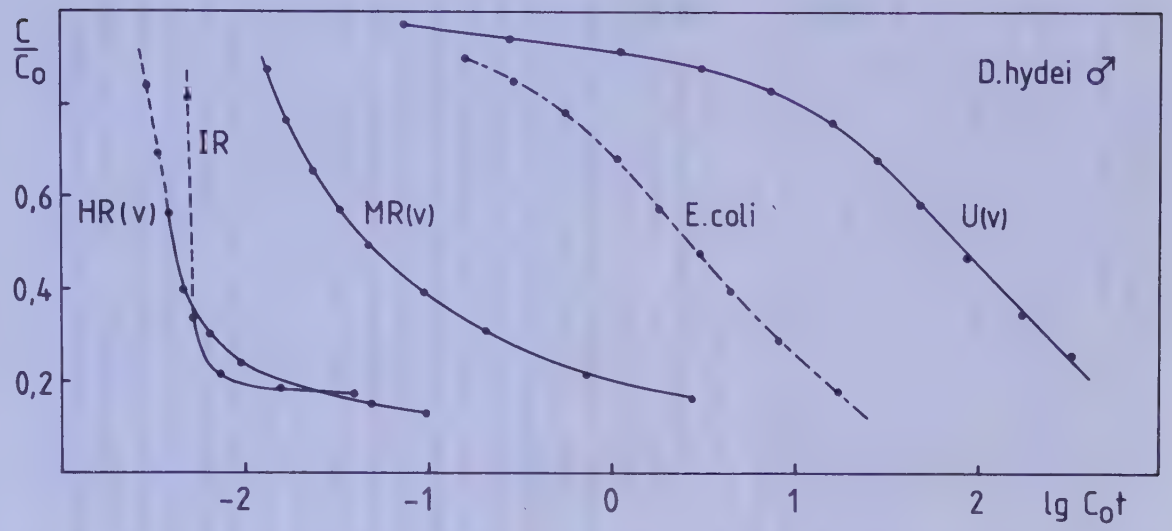


Abb. 5: Renaturierung der über HAP gewonnenen DNA aus D.hydei-Männchen nach der Vorhybridisierung; 2.4 M TEACl, 45°C. Der gestrichelte Kurvenverlauf (IR und HR(v)) kennzeichnet die Renaturierung während der Abkühlphase in der Gilford-Schmelzküvette ausgehend von 70°C vor Erreichen der Reaktionstemperatur von 45°C. Standard: E.coli-DNA. IR = "inverted repeat"-DNA; HR(v) = vorhybridisierte hochrepetitive DNA; MR(v) = vorhybridisierte mittelrepetitive DNA; U(v) = vorhybridisierte "unique"-DNA. C = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) im Verlauf der Reaktion; C_o = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) vor Reaktionsbeginn; t = Zeit (sec).

Von der U-DNA konnten pro Reaktionsansatz nicht mehr als 50% hybridisiert werden (Spalte 6). Die gewählten Reaktionsbedingungen, insbesondere das Verhältnis der Menge von immobilisierter zu mobiler DNA erlauben zwar die Hybridisierung einer absolut gesehen relativ großen DNA-Menge pro Reaktionsansatz, bei der Reaktionszeit von 3 - 4 Tagen (72 - 96 h, Spalte 5) muß damit wegen der hohen Komplexität allerdings die Unvollständigkeit der Reaktion in Kauf genommen werden. Die "gepoolte", nicht hybridisierte DNA aus mehreren Reaktionsansätzen wurde erneut zur Vorhybridisierung eingesetzt. Die aus dieser Reaktion erhaltene vorhybridisierte U(v)-DNA zeigt in der $C_o t$-Analyse (Abb. 5) keinen Unterschied zur Reassoziationskinetik der entsprechenden Ausgangsfraktion (U-DNA, Abb. 4).

In Spalte 7 der Tab. 2 sind die Mengen an vorhybridisierter DNA aufgeführt, die für die Anreicherungshybridisierungen zur Verfügung standen. Sie waren z.B. für die MR-DNA mit nur 63 µg durchzuführen. Unter der Annahme, daß dabei 95% dieser Fraktion hybridisieren würden, stünden für nachfolgende Analysen nur noch etwa 3 µg zur Verfügung. Dieser Wert würde noch um die, bei der jeweiligen Rückgewinnung der DNA entstehenden, zum Teil erheblichen Verluste weiter reduziert werden. Diese Überlegung zeigt, daß eine Analyse der mit hypothetischen, Y-spezifischen Sequenzen angereicherten DNA-Probe mit zunehmender Quantität erleichtert wird, so daß es deshalb wünschenswert ist, eine möglichst große Menge vorhybridisierter DNA für die Anreicherungshybridisierung einzusetzen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Vorhybridisierung der über HAP nach Komplexitätsklassen vorfraktionierten DNA aus Männchen die Bereitstellung von vollständig "hybridisierfähiger", einheitlich komplexer DNA für die Anreicherungshybridisierung ermöglicht. Damit wird eine grundsätzliche Vorbedingung für eine effektive Anreicherung Y-spezifischer Sequenzen während einer "erschöpfenden" Hybridisierung der vorhybridisierten DNA gegen entsprechende Weibchen-DNA gleicher Komplexität erfüllt.

4. Anreicherungshybridisierung

Die Anreicherung Y-spezifischer DNA-Sequenzen erfolgt durch eine möglichst vollständige Hybridisierungsreaktion zwischen der nach Komplexitätsklassen vorfraktionierten und vorhybridisierten DNA aus Männchen (X/Y) und der immobilisierten DNA gleicher Komplexität aus Weibchen (X/X). Das durch diesen Vorgang erzielte Ausmaß der Anreicherung, d.h. das Verhältnis der Häufigkeiten einer hypothetisch spezifischen Sequenz in der Fraktion angereicherter DNA gegenüber genomischer DNA, kann theoretisch durch einen sog. Anreicherungsfaktor angegeben werden. Bestimmend hierfür ist die Vollständigkeit der Hybridisierungsreaktion.

4.1. Bestimmung theoretischer Anreicherungsfaktoren

Um die Parameter für die Anreicherungshybridisierung zu optimieren, wurde für die Männchen-DNA jeder Komplexitätsklasse in einem der Vorhybridisierung analogen Experiment zunächst bestimmt, wie quantitativ sie gegen immobilisierte DNA aus dem gleichen Genom (X/Y) hybridisierbar ist. Unter Berücksichtigung der "release"-Rate des kovalent gekuppelten Reaktionspartners (Freisetzung an immobilisierter DNA), wird dabei der theoretisch maximal erreichbare Anreicherungsfaktor ermittelt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Bestimmung der maximalen Anreicherungsfaktoren wird am Beispiel der MR(v)-DNA beschrieben und erläutert.

Ein Aliquot der ^{3}H-markierten MR(v)-DNA aus Männchen (s. Tabelle 2) wird möglichst vollständig mit einem Überschuß an immobilisierter Männchen-DNA der gleichen Komplexität zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsverlauf wird durch die Abnahme der Radioaktivitätsmenge im Kreislauf verfolgt bis keine weitere Abnahme erfolgt. So können auch bei einer Reaktionszeit von > 8 h nicht mehr als 96.4% der zirkulierenden

1	2	3	4	5	6		7	
DNA-Fraktion	immob. DNA	mob. DNA	Reaktions-zeit	% hybrid. DNA	"release"-Rate		maximaler Anreicherungsfaktor: Korrektur durch effekt. "release"-Rate	
					total	effektiv		
	(µg)	(µg)	(h)		%/24h	%/24h	(-)	(+)
HR(v)-DNA	40	22	2,25	98,4	2	0.22	625	610
MR(v)-DNA	95	17,5	8	96,4	2	0.66	146	110
U(v)-DNA	200	50	117	78	2	1	6,4	3,4

Tabelle 3: Bestimmung theoretischer Anreicherungsfaktoren für spezifische DNA-Sequenzen verschiedener Komplexitätsklassen durch "erschöpfende" Hybridisierung zwischen mobiler, vorhybridisierter Männchen-DNA und immobilisierter DNA aus Männchen in 2.4 M TEACl bei 45°C unter Berücksichtigung der "release"-Raten. Erläuterungen s. Text.

^{3}H-markierten DNA durch Hybridisierung mit ihren homologen, immobilisierten Reaktionspartnern aus der mobilen Phase entfernt werden. Die verbleibende DNA-Menge von 3.6% (0.63 µg von 17.5 µg, Spalte 3) ist bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen für die Anreicherung Y-spezifischer DNA limitierend. Sie bildet die "Verunreinigung" in der Fraktion der angereicherten Y-spezifischen Sequenzen. Eine nicht-hybridisierende Y-spezifische DNA kann also gegenüber der "verunreinigenden" Rest-DNA insgesamt nur um einen theoretischen Faktor angereichert werden, der sich folgendermaßen berechnen läßt:

$$\frac{\text{Gesamtmenge hybridisierfähige DNA}}{\text{Menge nicht-hybridisierte DNA}} = \frac{100}{3.6} = 27.8$$

Für die MR(v)-DNA, die nur ca. 19% der Gesamt-DNA ausmacht, wäre dann der maximal erreichbare absolute Anreicherungsfaktor bezogen auf das Gesamt-Genom, 100/19 x 27.8 = 146, entsprechend einer mehr als 100-fachen Anreicherung. Dieser theoretische Wert muß noch korrigiert werden, weil unabhängig von der Hybridisierung permanent kovalent gekuppelte DNA vom Trägermaterial freigesetzt wird ("release"-Rate), welche die Menge der "verunreinigenden" DNA mit zunehmender Reaktionsdauer permanent erhöht.

Zur Bestimmung der "release"-Rate wurde ^{3}H-markierte DNA der betreffenden Komplexitätsklasse an Sephacryl S-500 immobilisiert. Nach der üblichen Vorinkubation von 2 - 3 Tagen in 2.4 M TEACl bei 45°C wurde die nicht stabil gekuppelte DNA bei 70°C eluiert. Anschließend wurde das Material in der Säule unter Hybridisierungsbedingungen für mehrere Tage inkubiert (2.4 M TEACl, 45°C, zirkulierendes Medium, Heizzone). Durch Messung der Radioaktivitätszunahme im Kreislauf konnte die effektive "release"-Rate ermittelt werden. Die gesamte Menge an freigesetzter DNA (totale "release"-Rate) wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 70°C für 30 min am Ende der Inkubationszeit bestimmt. Auf diese Weise konnte der Anteil an freigesetzter DNA erfaßt werden, der wieder mit immobilisierter DNA hybridisiert hatte.

Die effektive "release"-Rate für die immobilisierte MR-DNA beträgt 0.66%/24 h. Demnach werden in der Reaktionszeit von 8 h 0.22% oder 0.21 µg von 95 µg immobilisierter DNA freigesetzt. Die Menge der "verunreinigenden" DNA erhöht sich damit von 0.63 µg auf 0.84 µg und der Anreicherungsfaktor ist dementsprechend zu korrigieren: 146 x (0.63 µg/0.84 µg) = 110.

Die in der Tabelle 3 aufgeführten Daten zeigen, daß mit zunehmender Komplexität und entsprechend längerer Reaktionszeit die Menge der "verunreinigenden" DNA steigt und damit der theoretische Anreicherungsfaktor für spezifische DNA-Sequenzen abnimmt. Diese Tatsache macht sich besonders stark bei der U-DNA bemerkbar. Angesichts dieses Sachverhalts wäre eine Verkürzung der Reaktionszeit durch eine Beschleunigung der Renaturierungsgeschwindigkeit insbesondere für diese Fraktion wünschenswert.

4.2. Versuche zur Beschleunigung der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierungsreaktion

Wie im vorangegangenen Kapitel dargelegt, wird die Effektivität der Anreicherung maßgeblich durch die Reaktionsdauer bestimmt. Durch eine Beschleunigung der Renaturierungsgeschwindigkeit wäre es möglich, diesen Parameter positiv zu beeinflussen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß sich die DNA-Reassoziationsraten in dem hier verwendeten Reaktionsmedium, 2.4 M TEACl, durch Zugabe anorganischer Salze wie NaCl oder LiCl z.T. erheblich steigern lassen (Orosz und Wetmur, 1977). Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wurden C_ot-Analysen von *E. coli*-DNA in 2.4 M TEACl bei 45°C unter Zusatz von 1 M NaCl bzw. 1 M LiCl durchgeführt. Die entsprechenden Reassoziationskinetiken (Abb. 6) zeigen, daß die Reaktionsbeschleunigung, zumindest in der ersten Reaktionshälfte, in Gegenwart von 1 M LiCl besonders stark ausgeprägt ist. Beim Vergleich des C_ot1/2-Wertes (C_ot1/2 = 0.16; lg C_ot1/2 = -0.9)

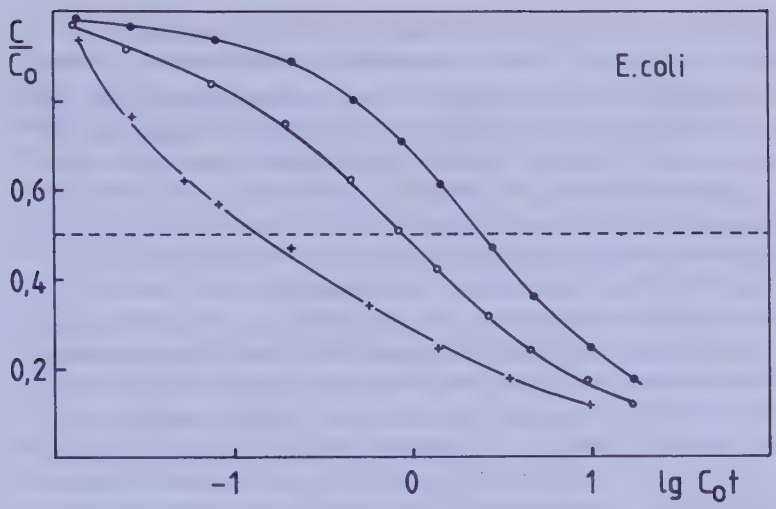


Abb. 6: Renaturierung von E. coli-DNA in 2.4 M TEACl ●——● ; 2.4 M TEACl + 1 M NaCl o——o ; 2.4 M TEACl + 1 M LiCl +——+ bei 45°C. C = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) im Verlauf der Reaktion; C_o = Konzentration der denaturierten DNA (Mole Nucleotide/l) vor Reaktionsbeginn; t = Zeit (sec).

mit dem der Kontrolle ($C_o t1/2 = 2.5$; $\lg C_o t1/2 = 0.3$) ergibt sich ein Beschleunigungsfaktor von 15 - 16. In Gegenwart von 1 M NaCl wird die Kinetik bei 50% der Reaktion etwa um den Faktor 2.8 beschleunigt. Merkwürdigerweise folgt dieser sehr schnellen ersten Phase eine Verlangsamung der Kinetik in der zweiten Reaktionshälfte sowohl in Gegenwart von LiCl wie in der Gegenwart von NaCl. Beide Kinetiken verlaufen jetzt sogar langsamer als die der Kontrolle, so daß der Beschleunigungsfaktor bei 80% der Reaktion von 15 auf 5 (LiCl) bzw. von 2.5 auf 2 (NaCl) reduziert wird. Die Ursache für diesen

uneinheitlichen Reaktionsverlauf ist unbekannt, könnte jedoch in einer Art "Ausfällungsreaktion" bestehen (s. unten).

Unabhängig von den Ursachen der Reaktionsbeschleunigung würde eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit selbst um einen Faktor 2 speziell für die "unique"-DNA einen erheblichen Zeitgewinn bedeuten. So würde sich unter den in Tab. 3 angegebenen Bedingungen die Reaktionszeit von 117 h für 78% Hybridisierung halbieren und der durch die effektive "release"-Rate korrigierte Anreicherungsfaktor würde immerhin von 3.4 auf 4.5 gesteigert. Es war daher zu überprüfen, ob auch die Kinetik der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierungsreaktion durch den Zusatz von 1.0 M NaCl oder 1.0 M LiCl in 2.4 M TEACl in gleicher oder ähnlicher Weise beschleunigt werden kann. Dazu wurde ^{3}H-markierte DNA aus E. coli mit immobilisierter, unmarkierter E. coli-DNA in 2.4 M TEACl unter Zusatz von 1.0 M NaCl bzw. 1 M LiCl im geschlossenen Kreislauf bei 45°C kontinuierlich zur Reaktion gebracht (s. Abb. 2). Der Reaktionsverlauf wurde wieder über die Abnahme der Radioaktivität im Kreislauf (durch die Entnahme von 5 - 10 µl Aliquots der zirkulierenden DNA) verfolgt. Gegenüber der Kontrolle ist unter Zusatz von 1.0 M NaCl bzw. 1.0 M LiCl für beide Salze tatsächlich eine erhebliche Beschleunigung der Radioaktivitätsabnahme im Kreislauf zu beobachten.

Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde zunächst die nichthybridisierte DNA bei 45°C eluiert, danach wurde die Temperatur auf 70°C erhöht, und die hybridisierte DNA aus der Säule gepumpt. Dabei konnte überraschenderweise nur ein geringer Bruchteil der theoretisch zu erwartenden Radioaktivitätsmenge zurückgewonnen werden. Es war daher zu vermuten, daß ein beträchtlicher Anteil der DNA in unspezifischer Weise an bestimmte Oberflächen des Kreislaufsystems niedergeschlagen war. Tatsächlich konnte die adsorbierte DNA mit Natronlauge (0.1 - 0.5 M) aus sämtlichen Bauteilen des Kreislaufsystems herausgespült werden.

Diese unspezifische Adsorption war unter Zusatz von LiCl besonders stark ausgeprägt. Für dieses Salz wird allerdings

auch von Orosz und Wetmur (1977) eine verringerte Löslichkeit der DNA oberhalb einer Konzentration von 1.0 M in 2.4 M TEACl beobachtet. Dagegen wird für NaCl bis zu einer Konzentration von 1.25 M in 2.4 M TEACl ein derartiges Verhalten der DNA bisher nicht beschrieben. Diese Ergebnisse machten jedoch deutlich, daß an eine Beschleunigung der Anreicherungshybridisierung durch den Zusatz von 1.0 M NaCl bzw. 1.0 M LiCl wegen der überlagerten Adsorption nicht zu denken war.

Es wurde deshalb versucht, polymere Anionen, wie Dextransulfat, einzusetzen, die in konzentrierten Lösungen ebenfalls eine Beschleunigung der DNA-Renaturierung bewirken (Chang et al., 1974; Wetmur, 1975). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde Dextransulfat dem 2.4 M TEACl-Reaktionsmedium zugesetzt. Auch dabei wurde eine unspezifische Absorption der DNA, diesmal durch das verwendete Trägermaterial (Sephacryl S-500), beobachtet, die offensichtlich bedingt war durch den Einschluß von DNA-Netzwerten in die S-500 Matrix.

Aus den genannten Gründen mußte deshalb auf eine Beschleunigung der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierungsreaktion durch den Zusatz von NaCl bzw. LiCl oder Dextransulfat verzichtet werden. Die einzige zuverlässige Möglichkeit zur Erhöhung der Reaktionsrate bestand daher in einer Maximierung der Konzentration an immobilisierter DNA (DNA-Menge/Masse Trägermaterial).

4.3. Ergebnisse der Anreicherungshybridisierung

Die Anreicherung Y-spezifischer DNA-Sequenzen der drei Fraktionen HR(v), MR(v) und U(v) erfolgte durch eine möglichst quantitative Hybridisierung gegen immobilisierte DNA aus Weibchen gleicher Komplexität (s. Schema 1). Die Ergebnisse der Anreicherungshybridisierungen für die drei unterschiedlich komplexen DNA-Fraktionen sind in Tab. 4 zusammenfassend dargestellt. Das Ausmaß der Anreicherung Y-spezifischer DNA-Se-

quenzen im Verhältnis zum Gesamtgenom kommt durch die Anreicherungsfaktoren unter Berücksichtigung der in Tab. 3 angegebenen effektiven "release"-Raten zum Ausdruck und wird hier für die einzelnen Fraktionen beschrieben.

4.3.1. Hochrepetitive DNA

Die Anreicherungshybridisierung der hochrepetitiven DNA (HR (v)-DNA) wurde in 2 Reaktionsansätzen durchgeführt. 61 µg immobilisierter Weibchen-DNA wurden kontinuierlich im geschlossenen Kreislauf mit jeweils 40 µg zirkulierender, ^{3}H-markierter DNA aus Männchen zur Reaktion gebracht. Der Abschluß der Reaktion wurde durch die Abnahme der Radioaktivitätsmenge im Kreislauf bis auf einen konstanten Endwert (nach etwa 3 h) ermittelt. Ausgehend von diesem Wert wurde der Prozentsatz an hybridisierter bzw. nicht-hybridisierter DNA bestimmt (Spalte 6). Nach der Elution der nicht-hybridisierten DNA bei 45°C, welche auch die angereicherten, Y-spezifischen Sequenzen enthalten sollte, wurde die hybridisierte DNA bei 70°C eluiert und die Radioaktivitätsmenge in diesem Eluat kontrolliert. Die ermittelten Werte dienten zur Errechnung des theoretisch absoluten Anreicherungsfaktors in Spalte 7 gemäß 4.1.

Von der HR(v)-DNA aus Männchen hybridisieren nur 91.2% mit der immobilisierten HR-DNA aus Weibchen (Spalte 6), entsprechend 8.8% an nicht-hybridisierter DNA. Das ist ein deutlicher Unterschied im Vergleich zum analogen Hybridisierungsexperiment mit immobilisierter Männchen-DNA derselben Komplexität, wobei die entsprechenden Prozentsätze 1.6% bzw. 98.4% (Spalte 5, Tab. 3) betragen.

Um diesen Unterschied zu sichern, wurde im Anschluß an die Elution der Anreicherungsfraktion bei 45°C, die hybridisierte DNA nach dem Abschmelzen bei 70°C ein weiteres Mal mit der immobilisierten Weibchen-DNA zur Reaktion gebracht (Abschmelzen bei 70°C im geschlossenen Kreislauf, Äquilibrierung für

1	2	3	4	5	6	7	
DNA-Fraktion	immob. DNA (µg/x g Feuchtmasse	mob. DNA (µg)	Anzahl der Ansätze	Reaktions-zeit (h)	% hybrid. DNA	Anreicherungsfaktor: Korrektur durch effekt. "release"-Rate (-)	(+)
HR(v)-DNA	61/0.5 (DPTE S-500)	40	2	2	91.2	128	128
MR(v)-DNA	170/0.4 (DPTE S-500)	27	2	16	96.5	150	84
U(v)-DNA							
1. Durchgang	250/0.56 (BrCN S-500)	163	2	107	67.8	4.4	3.6
2. Durchgang (nicht hybrid. DNA aus 1.	250/0.56 (BrCN S-500)	100	1	137	54.9	3.1	2.4
						4.4x3.1 = 13.6	3.6x2.4 = 8.6

Tabelle 4: Ergebnisse der Anreicherungshybridisierung (2.4 M TEACl, 45°C) zwischen mobiler Männchen und immobilisierter Weibchen-DNA.

30 min bei 70°C, Hybridisierung für 180 min bei 45°C). Dabei blieb mit 2.3% eine ähnlich große Restmenge an nicht-hybridisierter DNA im Kreislauf zurück, wie bei der Hybridisierung gegen Männchen-DNA. Für den zweiten Reaktionsansatz wurden fast identische Werte ermittelt.

Der Unterschied von etwa 7% an hybridisierter DNA in den beiden analogen Versuchen war logisch nur durch das Vorhandensein Y-spezifischer, hochrepetitiver DNA-Sequenzen in der Anreicherungsfraktion zu erklären. Diese Sequenzen sollten demnach etwa 7% der HR-DNA ausmachen. Unter Berücksichtigung der Menge an HR-DNA im Gesamtgenom von ca. 10% (Schema 2) würde der Anteil dieser Y-spezifischen Sequenzen am Genom von D. hydei ca. 0.7% betragen.

4.3.2. Mittelrepetitive DNA

Die Anreicherungshybridisierung der mittelrepetitiven DNA (MR(v)-DNA) wurde ebenfalls in 2 Reaktionsansätzen durchgeführt, mit jeweils 27 µg Männchen-DNA in der mobilen Phase und einem fast 7-fachen Überschuß an immobilisierter Weibchen-DNA (170 µg). Da die zur Immobilisierung verwendete MR-DNA aus Weibchen im Gegensatz zur Männchen-DNA nicht vorhybridisiert war, enthielt sie noch einen erheblichen Anteil an "unique"-Sequenzen (ca. 40 -50%, s. Abb. 4). Daher war der tatsächliche Überschuß hinsichtlich der mittelrepetitiven Sequenzen nur etwa halb so groß.

Am Ende der Hybridisierung, nach einer Reaktionszeit von 16 h, betrug der Prozentsatz an hybridisierter DNA 96.5% (Spalte 6). Dieser Wert ist nahezu identisch mit dem entsprechenden Prozentsatz bei der Hybridisierung gegen Männchen-DNA (96.4%; Spalte 5, Tab. 3). Somit ist bei ähnlich hohem Auflösungsvermögen wie für die HR-DNA, keine Selektion Y-spezifischer DNA-Sequenzen durch den Anreicherungsvorgang erkennbar.

Unter der Annahme, daß die ermittelten hybridisierten Mengen jeweils um die Beträge von ± 0.5% falsch sein können, läßt

sich abschätzen, daß die etwaigen Y-spezifischen MR-Sequenzen maximal 0.2% des Gesamtgenoms betragen können, wenn die mittelrepetitiven Sequenzen 19% der Gesamt-DNA ausmachen.

4.3.3. "Unique"-DNA

Die Anreicherungshybridisierung der "unique"-DNA (U(v)-DNA) erfolgte in 2 Durchgängen. Im ersten Durchgang wurde in 2 Reaktionsansätzen jeweils eine relativ große Menge Männchen-DNA (163 µg) in der mobilen Phase zur Hybridisierung gegen die immobilisierte Weibchen-DNA (250 µg) eingesetzt. Damit war beabsichtigt, nach einer begrenzten Reaktionszeit den größten Teil unspezifischer DNA abzutrennen (67.8% nach 107 h). Die nicht-hybridisierte, etwaige Y-spezifische Sequenzen enthaltende DNA der beiden Ansätze wurde "vereinigt" und in einem 2. Durchgang mit der durch die 70°C-Elution regenerierten immobilisierten DNA aus Weibchen erneut zur Reaktion gebracht. Obwohl sich in der mobilen Phase jetzt nur noch 100 µg befanden und trotz der im Vergleich zum 1. Durchgang längeren Reaktionszeit von 137 h, waren nur noch 54.9% hybridisierbar (vgl. Tab. 4).

Durch diese 2-stufige Reaktion war es möglich, den durch die effektive "release"-Rate korrigierten, theoretischen Anreicherungsfaktor bezogen auf das Gesamtgenom von 3.4 (Spalte 7, Tab. 3) auf 8.6 (Spalte 7, Tab. 4) zu steigern. Dabei wirkte sich auch die maximierte Konzentration an immobilisierter DNA (250 µg/0.56 g Feuchtmasse, Spalte 2, Tab. 4) sowie das Verhältnis der Mengen an immobilisierter zu mobiler DNA positiv aus. Aufgrund der vergleichsweise relativ hohen DNA-Menge in der mobilen Phase (vgl. Spalte 3 der Tabellen 3 und 4) wurde der relative Anteil an freigesetzter immobilisierter DNA aus Weibchen und damit die Menge an "verunreinigender" DNA in der Anreicherungsfraktion gedrückt.

Im Vergleich zu den anderen beiden Fraktionen ist insgesamt der Anreicherungsfaktor der "unique"-DNA, bedingt durch die

Komplexität dieser Fraktion, um etwa 1 Größenordnung niedriger.

4.4. Schmelzanalysen

Die heterogene DNA/DNA-Hybridisierung kann nur dann zur Selektion chromosomenspezifischer Sequenzen eingesetzt werden, wenn die Hybridbildung zwischen homologen DNAs ungehindert und möglichst sequenzspezifisch ablaufen kann. In dem hier verwendeten Reaktionsmedium, 2.4 M TEACl ist die Schmelztemperatur unabhängig von der Basenzusammensetzung. Daher läßt sich in diesem Medium jede Beeinflussung der Hybridbildung durch sterische oder andere Faktoren direkt an der Verschiebung des Tm-Wertes erkennen.

Um die Qualität der Hybridbildung zwischen immobilisierter DNA aus Weibchen und mobiler DNA aus Männchen zu überprüfen, wurde im Anschluß an die Anreicherungshybridisierung von allen drei Fraktionen eine Schmelzanalyse durchgeführt. Dazu wurde die bei 45°C hybridisierte DNA durch Temperaturerhöhung in 1 - 2°C Intervallen eluiert. Die Quantifizierung erfolgte entweder durch graphische Auswertung der bei 260 nm erhaltenen Elutionsprofile oder durch Messung der freigesetzten Radioaktivitätsmengen. Die auf diese Weise erhaltenen Schmelzprofile sind in Abb. 7, b-d (ausgefüllte Symbole) dargestellt. Zum Vergleich sind die optisch erhaltenen Werte der in homogener Lösung im Gilford-System (Schmelzküvette) durchgeführten Schmelzanalysen vorhybridisierter DNA gleicher Komplexität eingezeichnet (offene Symbole).

Es zeigt sich, daß die Schmelzprofile der Hybride für jede Komplexitätsklasse nahezu deckungsgleich mit denen in homogener Lösung sind. Demzufolge wäre das Ausmaß der Fehlpaarung bei der Hybridbildung nicht größer als in homogener Lösung. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den von Bünemann (1982) gefundenen Daten bezüglich des Schmelzverhaltens von Hybriden zwischen mobiler und an Sephacryl S-500

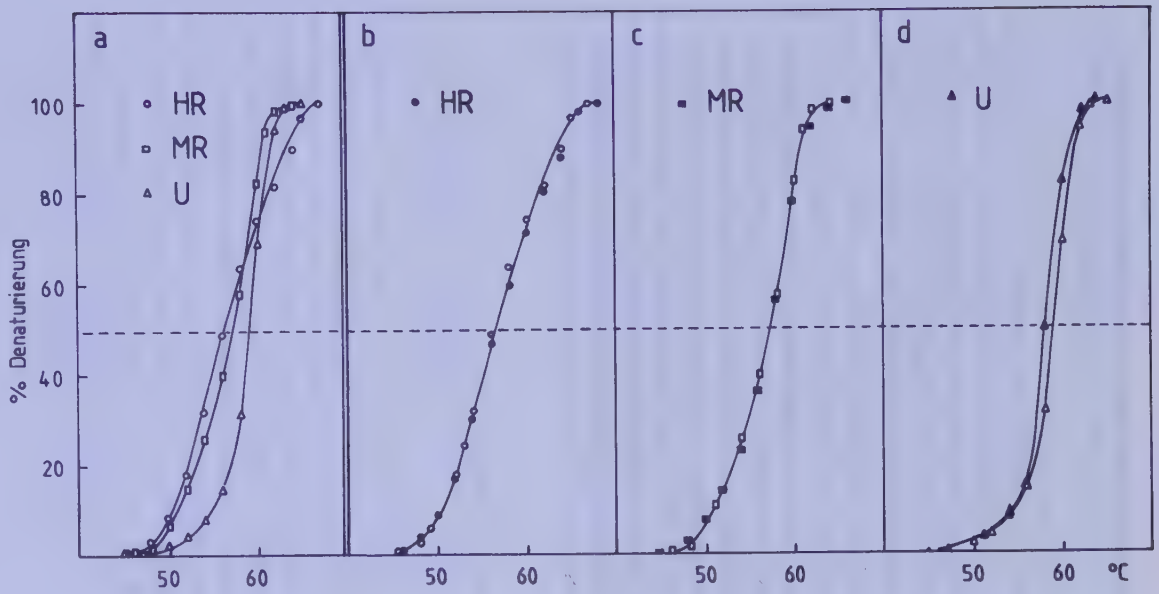


Abb. 7: a: Schmelzprofile von renaturierter DNA unterschiedlicher Komplexitätsklassen (HR, MR, U) aus D. hydei in homogener Lösung, 2.4 M TEACl; b-d: Schmelzverhalten von Hybriden zwischen immobilisierter und mobiler DNA (ausgefüllte Symbole) im selben Medium jeweils im Vergleich zu a (offene Symbole).

immobilisierter DNA, sofern die Immobilisierung über das BrCN-(Arndt-Jovin, 1975) oder Diazotierungsverfahren (DPTE, Seed, 1982) erfolgt.

Die geringfügige Verschiebung des Tm-Werts von etwa 1°C bei der "unique"-DNA kann nicht als gesichert gelten. Andererseits könnte sie ein Hinweis sein auf den Beginn einer möglichen Schädigung der DNA bei längerer Reaktionszeit (> 5 d) und der damit verbundenen Reduzierung an thermischer Stabilität der gebildeten Hybride.

In Abb. 7, a sind die in homogener Lösung erhaltenen Schmelzprofile der drei DNA-Fraktionen zusammenfassend dargestellt. Die Verringerung des Tm-Werts um ca. 3°C von renaturierten repetitiven DNA-Sequenzen (HR- und MR-DNA) im Vergleich zur "unique"-DNA sowie das Schmelzen über einen relativ weiten Temperaturbereich, stehen im Einklang mit den aus der Literatur bekannten Daten (Britten und Kohne, 1968). Damit wird die teilweise Verwandtschaft oder Degeneration durch Mutationen von repetitiven Sequenzfamilien zum Ausdruck gebracht.

5. Versuche zur Bestätigung der Anreicherung Y-chromosomaler DNA

Eine quantitative Aussage für das Vorhandensein Y-chromosomaler Sequenzen in den verschiedenen Fraktionen der Anreicherungshybridisierung war nur durch den Einsatz von klonierter DNA zu erreichen. Für die beiden Fraktionen repetitiver DNA(HR_Y und MR_Y) konnte dagegen eine qualitative Bestätigung der Anreicherung direkt mit einem Teil der angereicherten DNA versucht werden. Wegen ihrer vermutlich geringen Komplexitäten waren bei einer radioaktiven Markierung dieser Anreicherungsfraktionen genügend hohe spezifische Aktivitäten einzelner Sequenzen zu erwarten, die ausreichen sollten, um bei vergleichenden Hybridisierungsexperimenten unterschiedlich intensive Signale zu liefern. Für die HR_Y-DNA konnte aus dem Ergebnis der Anreicherungshybridisierung außerdem auf das Vorhandensein eines beträchtlichen Anteils Y-spezifischer Sequenzen (ca. 7%) in dieser Komplexitätsklasse geschlossen werden.

5.1. Hybridisierung von HR_Y- und MR_Y-DNA mit genomischer DNA aus Männchen und Weibchen

Bei der Hybridisierung der HR_Y- und MR_Y-DNA gegen die mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaute DNA aus Männchen und Weibchen, ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Beide Fraktionen hybridisieren wesentlich stärker mit dem Männchen-Genom (Abb. 8, a und b). Damit wird das Vorhandensein Y-chromosomenspezifischer Sequenzen in diesen Fraktionen und deren Konzentrierung durch das Anreicherungsverfahren bestätigt. Interessanterweise werden die mit HR_Y-DNA hybridisierenden Sequenzen im Genom nur durch Alu I effizient verdaut, was darauf hinweist, daß es sich nicht um sehr viele unterschiedliche Sequenzgruppen handeln kann.

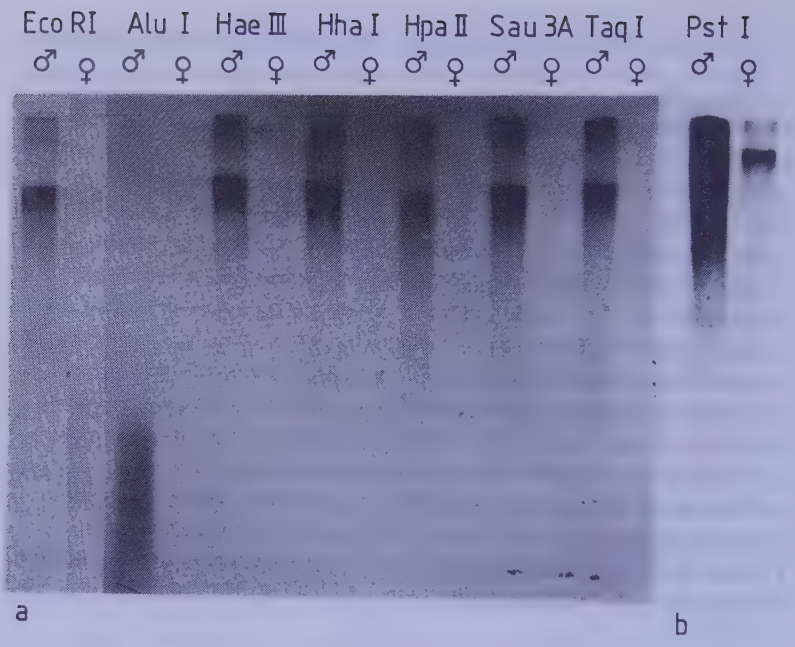


Abb. 8: Autoradiographien zweier Southern-Filter: je 2 µg von Männchen- und Weibchen-DNA wurden mit Restriktionsenzymen verdaut und mit ^{32}P-markierter HR_Y- (a) und MR_Y-DNA (b) hybridisiert.

5.2. In situ-Hybridisierung von HR_Y-DNA an Metaphase-Chromosomen

Im Gegensatz zur MR_Y-DNA war von der HR_Y-DNA eine genügend große Menge vorhanden (ca. 4 µg), um einen Teil dieser Fraktion auch zur in situ-Hybridisierung an Metaphase-Chromosomen von Männchen einzusetzen. Wie Abb. 9, a und b zeigen, ergibt die in situ-Hybridisierung mit HR_Y-DNA eine deutliche präferentielle Markierung jeweils eines Chromosoms, welches

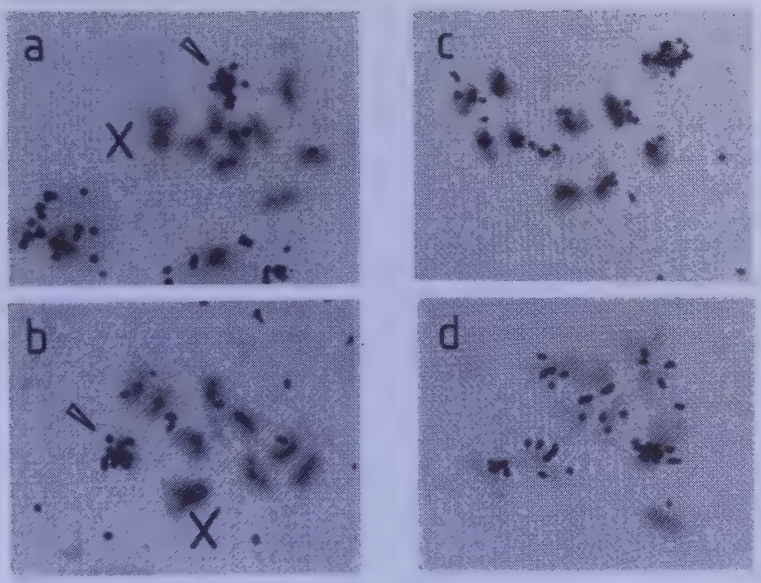


Abb. 9: In situ-Hybridisierungen mit HR_Y-DNA (a, b) und hochrepetitiver DNA aus Weibchen (c, d) an Metaphase-Chromosomen von Wildtyp-Männchen; hybridisiert wurde mit je 25000 cpm ^{3}H-DNA (spezifische Aktivität: 2×10^6 cpm/µg) pro Präparat. Expositionszeit: 8 Tage.

fast vollständig mit Silberkörnern bedeckt ist (Pfeile in Abb. 9, a und b) Da neben dem heterochromatischen Arm des Y-Chromosoms kein weiteres heterochromatisches Chromosom zu erkennen ist, muß es sich hier um das Y-Chromosom handeln. Damit werden die Ergebnisse der entsprechenden Filterhybridisierungen gestützt.

Zur Kontrolle wurde die entsprechende DNA-Fraktion (HR-DNA) aus Weibchen ebenfalls gegen Mitose-Präparate von Männchen hybridisiert. Hier zeigen die Metaphasen eine relativ gleichmäßige Verteilung der Silberkörner auf fast alle Chromosomen (Abb. 9, c und d).

IV. ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG Y-SPEZIFISCHER, HOCH-REPETITIVER DNA-SEQUENZEN

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente lieferten erste Hinweise für die Existenz hoch- und mittelrepetitiver, Y-chromosomaler DNA-Sequenzen. Die Anreicherung hatte den Zweck, eine aussichtsreiche Möglichkeit für die Isolierung solcher Sequenzen aus dem Genom zu eröffnen. Dabei wurde an zwei Wege gedacht. Die eine Möglichkeit bestand darin, die angereicherte DNA in einem E. coli-System zu klonieren mit anschließender Identifizierung Y-spezifischer Klone auf dem Wege der "Hybri-Dot"-Technik. Für weitergehende Analysen konnten dann einzelne dieser Klone zum "Screening" einer Bibliothek von DNA aus D. hydei-Männchen eingesetzt werden.

Die andere Möglichkeit war der direkte Einsatz der HR_Y- und MR_Y-DNA zum differentiellen "Screening" einer solchen Bibliothek. Die Voraussetzungen dafür waren sehr günstig, da die Anreicherung hoch genug war, um selbst bei einer Hybridisierung gegen die Gesamt-DNA aus Männchen und Weibchen einen wirklichen Unterschied zu erzeugen (Abb. 8). Aus diesem Grunde erschien es vernünftig, diesen Weg zur Isolierung Y-chromosomenspezifischer Sequenzen einzuschlagen. Da von der HR_Y-DNA im Vergleich zur MR_Y-DNA eine etwa 10-fach größere Menge (4 µg zu 0.4 µg), für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung stand, wurden die entsprechenden Versuche zum "Screening" einer Bibliothek von DNA aus D. hydei-Männchen in dieser Arbeit nur mit der HR_Y-Fraktion durchgeführt.

1. Identifizierung und Isolierung "Y-spezifischer" Phagen-Klone

Zum differentiellen "Sreening" einer Bibliothek von DNA aus D. hydei-Männchen im Lambda EMBL 3-Phagen (s. II. 10.) wurde eine Platte mit ca. 7000 Phagen-Plaques eingesetzt. Je zwei Replica-Filter wurden entweder mit der HR_Y-DNA bzw. mit

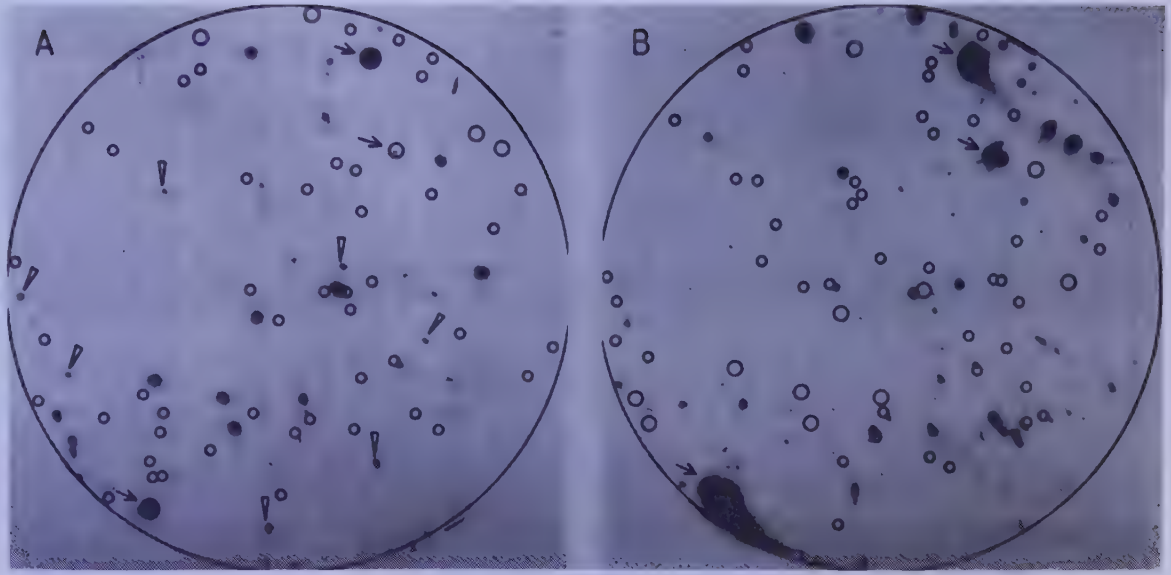


Abb. 10: Replica auf Nitrocellulose von einer Platte mit 7000 Phagen-Plaques aus einer Bibliothek von D. hydei-Männchen-DNA in Lambda EMBL 3-Phagen. A: Hybridisierung mit HR_Y-DNA (spezifische Aktivität: 1.5 x 10^8 cpm/µg). B: Hybridisierung mit HR-DNA aus Weibchen (spezifische Aktivität: 1 x 10^8 cpm/µg). Die Kreise kennzeichnen Positionen, auf denen in der jeweils anderen Autoradiographie Hybridisierungssignale zu erkennen sind.

der entsprechenden HR-DNA aus Weibchen hybridisiert. Das überraschende Ergebnis dieses Experiments zeigen die beiden Autoradiographien in Abb. 10. Von den ca. 120 - 160 Hybridisierungssignalen auf jeder Platte sind nur 2 - 3 (Pfeile in Abb. 10) in ihrer Position deckungsgleich. Diese auf beiden Filtern deckungsgleichen Signale sind in der Autoradiographie mit hochrepetitiver DNA aus Weibchen jeweils um eine Größenordnung stärker ausgeprägt als in der Autoradiographie mit HR_Y-DNA (vgl. Pfeile in Abb. 10 A und B). Wahrscheinlich enthalten diese Klone satellitenähnliche Sequenzen, die im übrigen Genom vorkommen und durch den Anreicherungsprozeß zwar stark ausgedünnt, aber nicht vollständig eliminiert werden konnten.

Insgesamt hybridisieren mit der HR_Y-DNA und der HR-DNA aus Weibchen nur etwa 300 (Summe der Signale beider Autoradiographien) der ca. 7000 Klone, was einem Anteil von ungefähr 4 - 5% entspricht. Damit sind die hochrepetitiven Sequenzen in der Bibliothek insgesamt unterrepräsentiert, da ihr Anteil am Genom ja ca. 10% ausmacht (s. Schema 2). Dieser Sachverhalt kann dadurch erklärt werden, daß das bei der Herstellung der Bibliothek verwendete Restriktionsenzym Sau 3A (s. II. 10.), die Mehrzahl der hochrepetitiven Sequenzen des Genoms nur unvollständig oder gar nicht verdaut wie Abb. 8 zeigt. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß die Bibliothek hinsichtlich solcher Sequenzen nicht repräsentativ ist

Die mit der HR_Y-DNA hybridisierenden Klone lassen sich hinsichtlich der Signalstärke (Abb. 10 A) in zwei bis drei Klassen differenzieren. Der ersten Klasse wären etwa 10 Klone zuzuordnen, welche ein starkes Hybridisierungssignal zeigen. Sie werden im Zusammenhang mit den folgenden Analysen als Y_L-Klone bezeichnet. Die zweite Kategorie besteht aus allen Klonen mit den nächst schwächeren Hybridisierungssignalen, von denen in Abb. 10 A einige beispielhaft mit einem Symbol (▽) gekennzeichnet sind. Sie werden künftig mit Y_S benannt. In eine dritte Klasse würden alle soeben oder kaum noch erkenn-

baren Signale fallen. Über ein "Subscreening" wurden jeweils einige Y_L-Klone und einige Y_S-Klone isoliert.

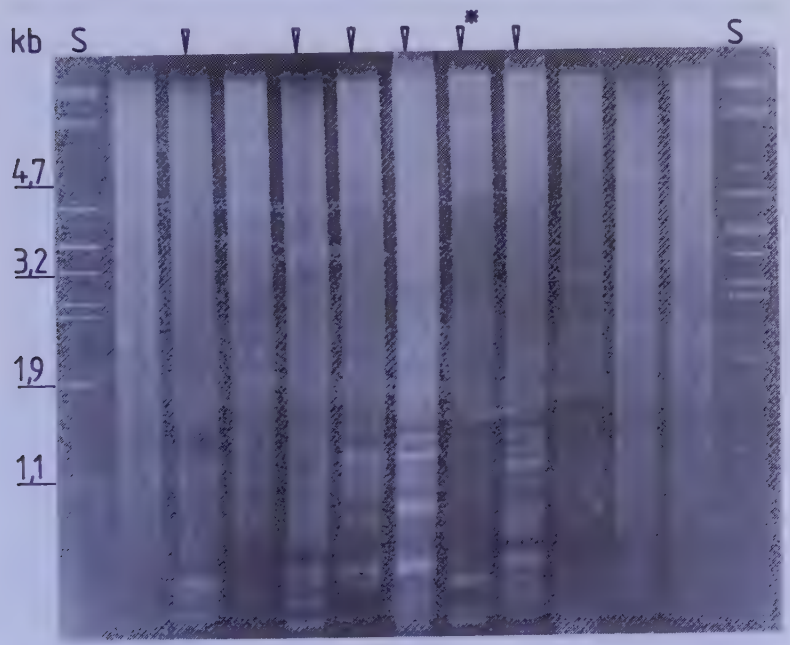


Abb. 11: Sal I-Restriktionsanalyse von DNA aus Mini-Lysaten verschiedener Lambda EMBL-3-Klone, die nach dem "Screening" mit HR_Y-DNA isoliert wurden. Die Markierungen (▽) kennzeichnen Klone, die in Abb. 10 A mit dem gleichen Symbol gekennzeichnet sind. * ist mit einem anderen Klon verunreinigt. Standard (S): Lambda/Eco RI, Bam HI.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden von den Mini-Lysaten dieser isolierten Klone zunächst Restriktionsanalysen mit Sal I durchgeführt (Sal I schneidet das "Insert" aus dem Lambda-Vektor heraus, ohne den Vektor selbst zu schneiden). Dabei fiel eine Klasse von Klonen auf, die untereinander ähnliche, aber nicht identische Restriktionsmuster mit einer

Vielzahl von Banden aufweisen (Markierungen mit ∇ in Abb. 11). Es handelt sich hierbei ausnahmslos um Y_S-Klone. Die häufigen Sal I-Schnittstellen scheinen auf eine Verwandtschaft der in diesen Phagen klonierten Sequenzen hinzudeuten.

2. Charakterisierung der isolierten Y_L- und Y_S-Klone

2.1. Hybridisierung gegen DNA aus Männchen und Weibchen

Besonders auffallend bei diesen Experimenten sind die Y_S-Klone. Alle vier der aus dieser Kategorie getesteten Klone zeigen mit Sal I-verdauter Männchen-DNA ein identisches und charakteristisches Hybridisierungsmuster über den gesamten Molekulargewichtsbereich (Abb. 12). Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß alle Y_S-Phagen verwandte Sequenzen enthalten, die im folgenden als "Sal I-Familie" zusammengefaßt werden. Die Sequenzen der Sal I-Familie hybridisieren auch nach längerer Expositionszeit nicht mit Weibchen-DNA.

Von den Y_L-Klonen (Abb. 13) hybridisiert Y_L11 ebenfalls ausschließlich mit der DNA aus Männchen. Zwei andere Klone aus dieser Kategorie, Y_L12 und Y_L14, zeigen dagegen neben der stark präferentiellen Hybridisierung mit der Männchen-DNA auch eine schwache (Y_L14) oder sehr schwache (Y_L12) Hybridisierung mit der DNA aus Weibchen.

Ein charakteristisches, gemeinsames Merkmal aller drei Y_L-Klone ist, daß sie im Gegensatz zu den Y_S-Klonen mit Sal I kaum verdaubarer DNA im Genom hybridisieren (Abb. 13 A). Bei der Hybridisierung gegen Alu I-verdaute DNA aus Männchen und Weibchen ändert sich das Bild (Abb. 13 B). Die zu Y_L14 homologen Sequenzen im Genom werden durch Alu I vollständig verdaut. Ihr Hybridisierungsmuster mit Y_L14 ist zwischen Männchen und Weibchen unterschiedlich. Die zu den beiden anderen Y_L-Klonen homologen Sequenzen werden durch Alu I schlechter verdaut und zeigen kaum eine Strukturierung im sonst gleichen Hybridisierungsmuster.

verdaut und zeigen kaum eine Strukturierung im sonst gleichchen Hybridisierungsmuster.

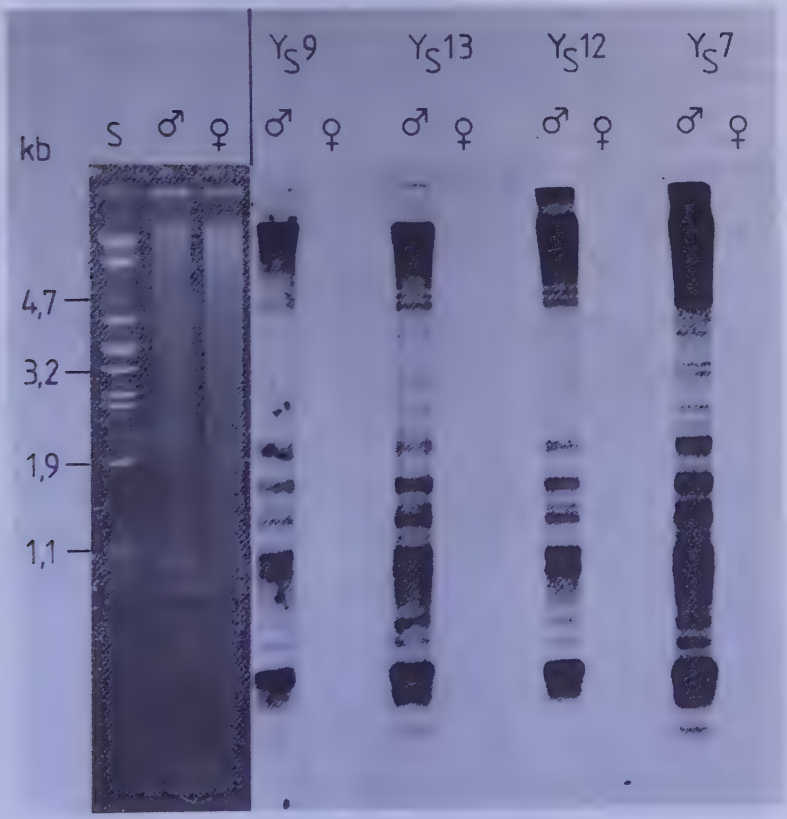


Abb. 12: Linke Hälfte: gelelektrophoretische Auftrennung (1.2% Agarose) von DNA aus D. hydei-Männchen und -Weibchen nach Verdauung mit Sal I; Molekulargewichts-Standard (S): Lambda/Eco RI, Bam HI. Rechte Hälfte: Autoradiographien von entsprechenden Southern-Filtern nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA aus vier verschiedenen Y_S-Klonen.

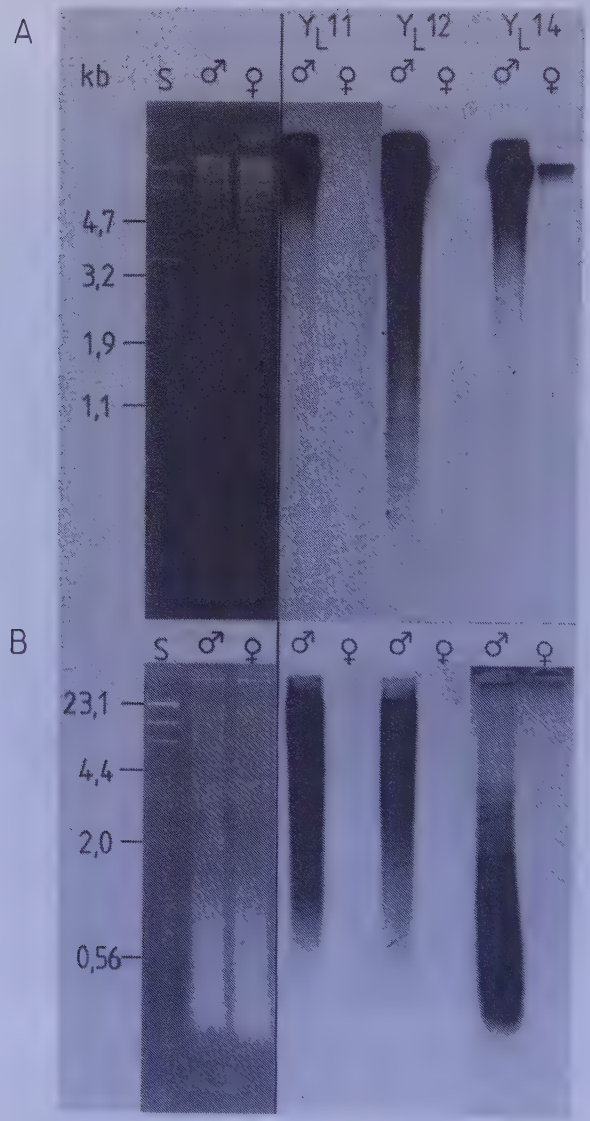


Abb. 13: Linke Hälften: geleletrophoretische Auftrennung (1.2% Agarose) von DNA aus Männchen und Weibchen nach Verdauung mit Sal I (A) und Alu I (B); Standard (S): Lambda/Eco RI, Bam HI (A) und Lambda/Hind III (B). Rechte Hälfte: Autoradiographien von entsprechenden Southern-Filtern nach der Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA aus drei verschiedenen Y_L-Klonen.

2.2 Kreuzhybridisierungen

Die charakteristischen Eigenschaften der Y_S-Klone bei der Spaltung mit Restriktionsenzymen hatte zur Sammelbezeichnung "Sal I-Familie" geführt. Anhand einer Kreuzhybridisierung wurde nun geprüft, inwieweit die klonierten, Y-spezifischen Sequenzen aus den verschiedenen Phagen untereinander tatsächlich Homologien zeigten. Es war ja auch möglich, daß sie jeweils nur ein kurzes repetitives Element bei sonst unterschiedlichen Sequenzen enthielten. Eine andere Möglichkeit war, daß die in ihnen klonierten Sequenzen in ihrer vollen Länge homolog oder eng miteinander verwandt waren.

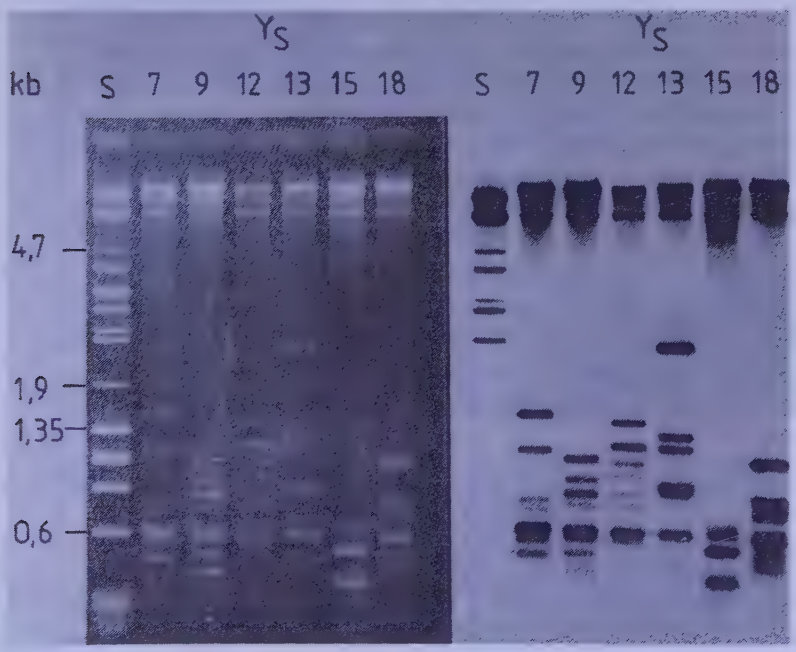


Abb. 14: Das Gelfoto zeigt die elektrophoretische Auftrennung von Sal I-verdauter DNA aus 6 verschiedenen Y_S-Phagen. Im Autoradiogramm rechts daneben ist die Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA aus dem Phagen Y_S13 zu sehen. Molekulargewichtsstandard (S): Lambda/ Eco RI, Bam HI + ØX 174/Hae III.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die DNA aus 6 verschiedenen Y_S-Phagen mit Sal I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 14, links). Nach der Hybridisierung des entsprechenden Southern-Filters mit der DNA eines dieser Klone (Y_S13) zeigt sich, daß alle im Gel mit Ethidiumbromid angefärbten Banden ein Signal geben (Abb. 14, rechts; die nicht hybridisierenden Banden des Klons Y_S7 sind auf eine Verunreinigung mit einem anderen, nicht zu dieser Klasse gehörenden Klon zurückzuführen). Die Intensität der autoradiographischen Signale entspricht dabei in etwa der Stärke der Banden im Gel. Die klonierte DNA aller Y_S-Phagen besteht demnach in ihrer ganzen Länge aus homologen oder verwandten DNA-Sequenzen. Die Hybridisierung auch mit den kürzesten Fragmenten der für jeden Klon unterschiedlichen Restriktionsmuster (< 0.6 kb) deutet auf eine geclusterte Anordnung verwandter repetitiver Sequenzeinheiten hin. Das für alle Y_S-Klone ähnliche Restriktionsfragment von ca. 0.6 kb Länge repräsentiert möglicherweise eine Art "Stammsequenz". Das unregelmäßige Vorkommen aller anderen Schnittstellen könnte als ein Hinweis auf eine starke Degeneration dieser ursprünglichen repetitiven Stammsequenz gelten.

Mit dem nächsten Kreuzhybridisierungsexperiment waren zwei Fragen zu klären, erstens, inwieweit die in den Y_L-Phagen klonierten Sequenzen untereinander homolog sind, und zweitens, ob mit den Sequenzen der Sal I-Familie (Y_S-Klone) Homologien bestehen. Die Autoradiographie in Abb. 15 beantwortet diese Fragen.

Die DNA der Y_L-Klone 11, 12 und 14 wurde mit Sau 3A verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (rechtes Gelfoto in Abb. 15). Sau 3A hinterläßt in der Vektor-DNA der Lambda-Phagen zahlreiche Schnitte, während von den klonierten Sequenzen aus den Y_L-Phagen 11 und 14 größere Fragmente übrigbleiben. Um in dem unübersichtlichen Bandenmuster der Vektor-DNA-einzelne Restriktionsfragmente der klonierten DNA identifizieren zu können, konnte das entsprechende Southern-Filter nicht mit der gesamten ^{32}P-markierten DNA (Vektor- + Insert-

DNA) hybridisiert werden. Stattdessen wurden isolierte Restriktionsfragmente der klonierten DNA des Phagen Y_L11 (Pfeil im rechten Gelfoto der Abb. 15) für die Hybridisierung eingesetzt.

Im linken Gelfoto der Abb. 15 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdauten DNA aus dem Phagen Y_S15 zu sehen.

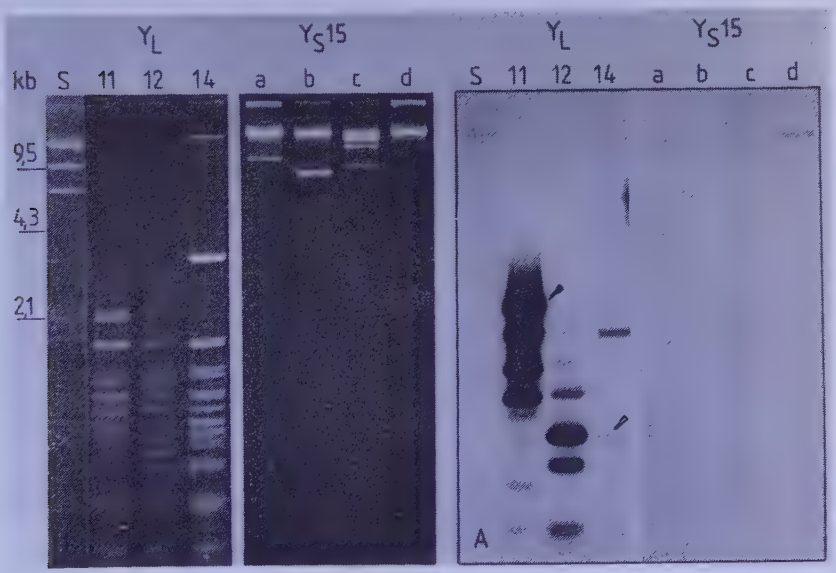


Abb. 15: Linkes Gelfoto (1): elektrophoretische Auftrennung von Sau 3A-verdauter DNA aus den Y_L-Phagen 11, 12 und 14; Standard (S): Lambda/Hind III Rechtes Gelfoto (2): elektrophoretische Auftrennung von DNA aus dem Klon Y_S15 nach Verdauung mit verschiedenen Restriktionsenzymen (a = Bam HI, b = Bgl II, c = Pvu I, d = Bal I). Rechte Hälfte (A): Autoradiographie des gemeinsamen Southern-Filters nach der Hybridisierung mit isolierten Sau 3A-Insert-Fragmenten (Markierung im Gelfoto 1) aus dem Klon Y_L11.

Mit beiden Gelen wurde ein gemeinsamer Southern-Transfer durchgeführt und das entsprechende Filter mit den Insert-Fragmenten des Klons Y_L11 hybridisiert (Autoradiogramm A in Abb. 15). Dabei zeigen sich starke Homologien zu drei weiteren, kleineren Restriktionsfragmenten der klonierten DNA aus dem gleichen Phagen. Weiterhin ist eine Hybridisierung mit klonierten Sequenzen aus Y_L12 zu sehen (ein starkes und drei schwächere Signale). Eine schwache Homologie besteht zu einem Restriktionsfragment der klonierten DNA aus Y_L14 (▽ im Autoradiogramm A). Alle übrigen Schwärzungen sind auf Hybridisierungen mit Resten an Vektor-DNA in der Probe zurückzuführen.

Die klonierten Y-spezifischen DNA-Sequenzen aus dem Phagen Y_L11 sind demnach nicht mit der Sal I-Familie verwandt. Verwandtschaft besteht hingegen mit dem Klon Y_L12 und sehr entfernt mit Y_L14.

Damit sind die isolierten Sequenzen drei verschiedenen Familien zuzuordnen, nämlich der Sal I-Familie (Y_S), der Sequenz-Familie aus Y_L11 und der aus Y_L14. Es war nun interessant zu wissen, ob diese Sequenzen jeweils mit bestimmten Regionen des Y-Chromosoms korreliert werden konnten.

3. Lokalisierung der Y_S- und Y_L-Sequenzen auf dem Y-Chromosom und in Interphasekernen

3.1. Filterhybridisierungen gegen Genotypen mit verschiedenen Fragmenten des Y-Chromosoms

Die Frage, ob die den drei Familien (Y_S, Y_L11 und Y_L14) zugehörigen Sequenzen über das gesamte Y-Chromosom verteilt sind, oder ob ihr Vorkommen auf bestimmte Bereiche des Y-Chromosoms begrenzt ist, konnte schlüssig durch entsprechende Filterhybridisierungen gegen DNA aus Fliegen mit definierten Frag-

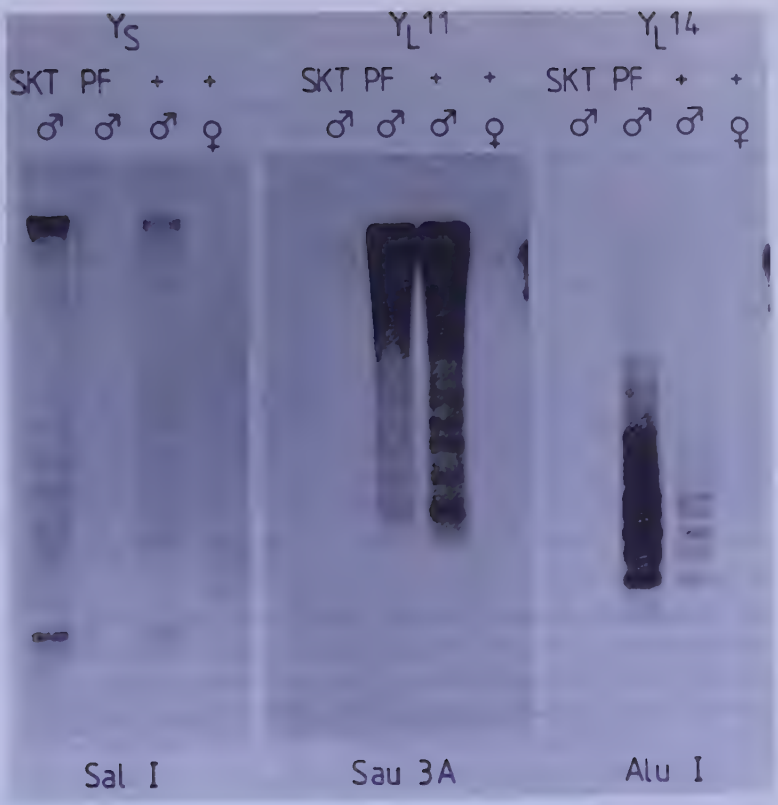


Abb. 16: Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA aus den Klonen Y_S, Y_L11 und Y_{14}gegen D. hydei-Genotypen mit unterschiedlichen Fragmenten des Y-Chromosoms nach Verdauung mit verschiedenen Restriktionsenzymen. SKT: Männchen mit dem SKT-Fragment des Y-Chromosoms; PF: Männchen mit dem PF-Fragment des Y-Chromosoms (s. Schema in Abb. 18). Kontrolle: Wildtyp Männchen und Weibchen.

menten des Y-Chromosoms beantwortet werden. Die Stammsammlung des Instituts enthält eine Reihe von sog. Translokationsstämmen mit unterschiedlichen X·Y-Translokationschromosomen, die von O. Hess hergestellt wurden. Durch geeignete Kreuzungen erhält man Tiere, die nur ein bestimmtes Y-Fragment besitzen (s. II. 3.). Zunächst wurde DNA aus Tieren eingesetzt, die entweder den SKT- oder den PF-Teil des Y-Chromosoms enthalten (nähere Erläuterung s. Abb. 18); die beiden Fragmente sind einander vollständig komplementär, da sie aus derselben reziproken X·3- Translokation hervorgegangen sind.

Die Auswertung der Hybridisierung zeigt, daß die Sequenzen der Sal I-Familie (Y_S) dem SKT-Teil und die Sequenzen der beiden anderen Familien (Y_L11 und Y_L14) dem PF-Teil (Abb. 16) zuzuordnen sind. Die schwache Hybridisierung der Y_L11-Sequenzen mit der DNA aus SKT-Tieren deutet jedoch an, daß eine geringe Anzahl von ihnen auch auf diesem Teil des Y-Chromosoms vorkommt.

Die Ergebnisse beweisen, daß keine der untersuchten Sequenzen gleichmäßig über das Y-Chromosom verstreut ist, sondern daß sie in bestimmten Teilen des Y-Chromosoms geclustert vorkommen. Von Interesse wäre nun die Beantwortung der Frage, ob das Vorkommen der Sal I-Familie im SKT-Fragment weiter eingegrenzt werden kann.

Bei Hybridisierung mit DNA aus Y_S-Phagen gegen Genotypen, die nur ein S-, Sk-, oder SKT-Fragment des Y-Chromosoms enthalten, zeigt sich weder hinsichtlich des Hybridisierungsmusters noch hinsichtlich der Intensität der autoradiographischen Signale ein Unterschied (Abb. 17). Die Intensitäten sind vielmehr proportional der aufgetragenen DNA-Menge, wie die Ethidiumbromid-Färbung des entsprechenden Gels zeigt. Daraus kann geschlossen werden, daß die Y_S-Sequenzen mit großer Wahrscheinlichkeit nur auf dem S-Fragment, d.h. auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms lokalisiert sind (s. Schema in Abb. 18). Damit wird die bereits geäußerte Vermutung der geclusterten Anordnung dieser Sequenzen (IV. 2.2.) weiter gestützt.

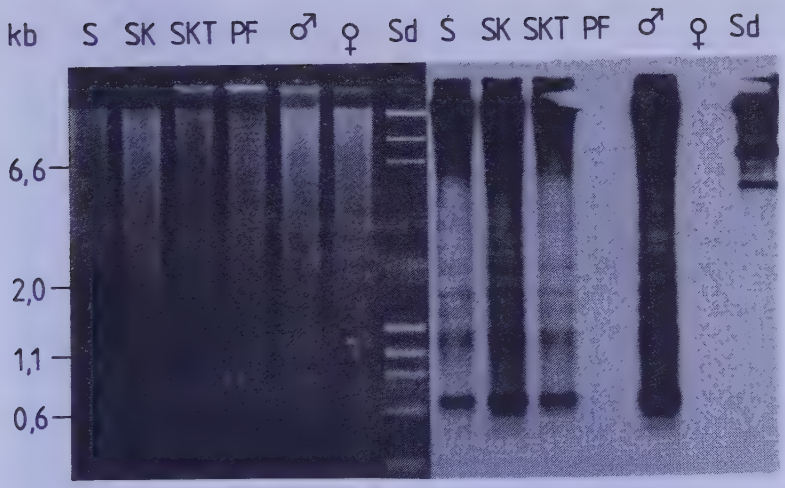


Abb. 17: Links: gelelektrophoretische Auftrennung von Sal I-verdauter DNA aus D. hydei-Männchen verschiedener Genotypen mit definierten Fragmenten des Y-Chromosoms. Rechts: Autoradiographie des entsprechenden Southern-Filters nach der Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Y_S-DNA. Kontrolle: Wildtyp Männchen und Weibchen. Standard (Sd): Lambda/Hind III + ØX 174/ Hae III.

3.2. Hybridisierungen in situ an Mitose-Chromosomen und an Interphasekernen

Die Ergebnisse der Southern-Filter-Hybridisierungsversuche erlauben aufgrund der verwendeten Translokationschromosomen den Schluß, daß die Y_S-Sequenzen (Sal I-Familie) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms lokalisiert sind, während die Y_L-Sequenzen dem langen Arm zuzuordnen sind. Da sich der kurze und der lange Arm des heterochromatischen Y-Chromosoms in Mitose-Präparaten gut unterscheiden las-

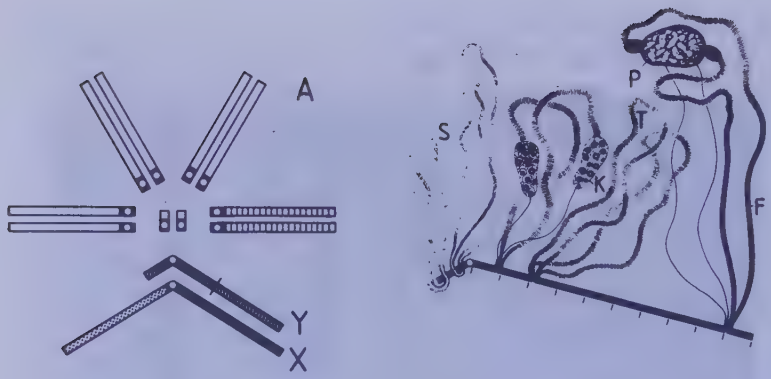


Abb. 18: Das Schema zeigt links die Darstellung der Chromosomen von D. hydei-Männchen in der Metaphase und rechts das Y-Chromosom in der meiotischen Prophase mit den ausgefalteten Lampenbürstenschleifen. Die Buchstaben S, K, T, P und S bezeichnen die Fertilitätsfaktoren.

A = Autosomen
X = X-Chromosom
Y = Y-Chromosom

S = Schlingen (Ns, nooses)
K = Keulen (Cl, clubs)
T = Tubulibänder (Tr, tubular ribbons)
P = Pseudonucleolus (Ps, pseudonucleolus)
F = Fäden (Th, threads)
Die in der Literatur verwendeten englischsprachigen Bezeichnungen sind in Klammern gesetzt.

Der Querstrich auf dem Y-Chromosom im Schema links zeigt die wahrscheinliche Position der Trennung in das SKT- und PF-Fragment bei der Herstellung von entsprechenden Genotypen, die entweder nur das SKT-Fragment oder das PF-Fragment enthalten. Diese beiden Fragmente sind vollständig komplementär zueinander. Die Schemazeichnungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. O. Hess zur Verfügung gestellt.

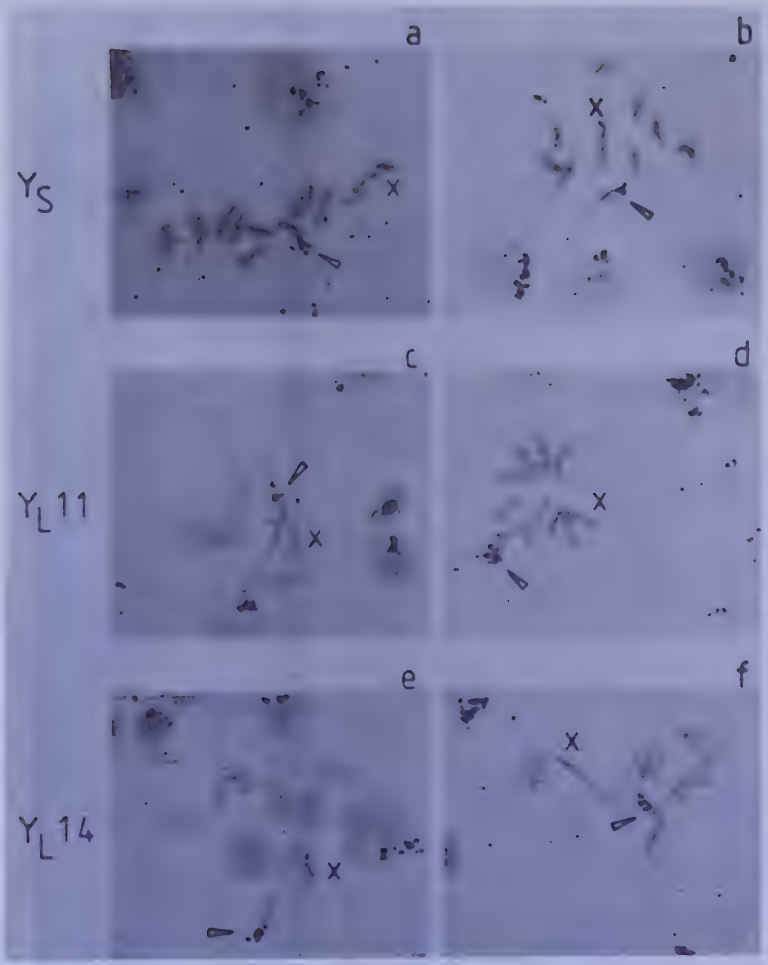


Abb. 19: In situ-Hybridisierungen mit Tritium-markierter DNA aus Y_S-, Y_L11- und Y_L14-Klonen an Metaphase-Chromosomen von Wildtyp-Männchen; spezifische Aktivitäten: 4 - 5 x 10^6 cpm/µg; 50000 - 100000 cpm ^{3}H-DNA pro Präparat; Exposition für 10 - 20 Tage. Die Pfeile bezeichnen das Y-Chromosom mit seiner spezifischen Markierung.

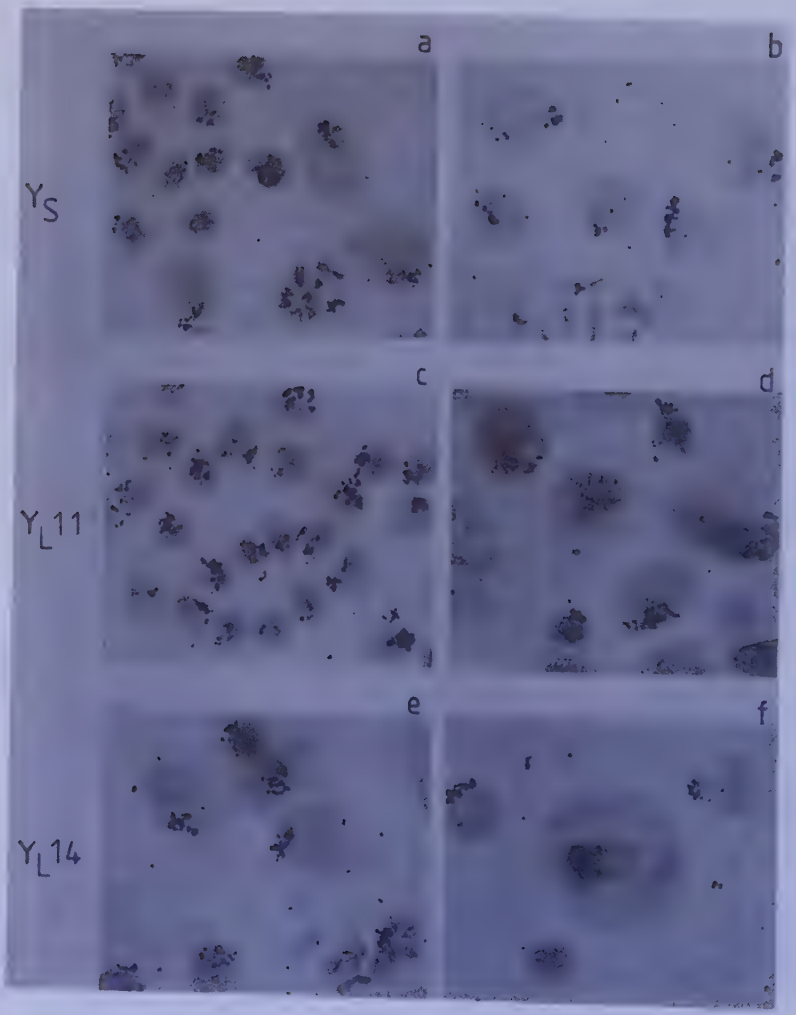


Abb. 20: In situ-Hybridisierung an Interphase-Kernen von Wildtyp-Männchen mit ^{3}H-markierter DNA (spezifische Aktivität: 4 - 5 x 10^6cpm/µg) aus Y_S- Y_L11- und Y_L14-Phagen; 60000 - 100000 cpm pro Präparat; Exposition: 10 - 20 Tage.

sen, wurde versucht, die Ergebnisse der Filterhybridisierungsexperimente zu erhärten. Darüber hinaus sollte eine genauere Aussage hinsichtlich der Positionen der Y_L-Sequenzen auf dem langen Arm ermöglicht werden.

Wie die Abb. 19 zeigt, hybridisieren die Y_S-Sequenzen in den Mitose-Präparaten tatsächlich nur mit dem kurzen Arm des Y-Chromosoms. Damit wird die Lokalisierung der Sal I-Familie auf dem S-Fragment bestätigt.

Bei der Hybridisierung mit Y_L11 und Y_L14-Sequenzen zeigt nur die Telomeren-Region des langen Arms vom Y-Chromosom eine spezifische Markierung mit Silberkörnern. Die Ergebnisse der entsprechenden Filterhybridisierungsexperimente können also dahingehend präzisiert werden, daß interessanterweise beide Sequenzfamilien am distalen Ende des langen Arms und somit in der Nähe der Fertilitätsfaktoren P und F lokalisiert sind (s. Schema in Abb. 18).

Hinsichtlich der Hybridisierung an Interphasekernen zeigen alle drei Sequenzen Gemeinsamkeit. Sie führen zu einer spezifischen Markierung heterochromatischer Strukturen (Abb. 20). Damit wird bewiesen, daß diese Sequenzen im Heterochromatin der Interphase-Kerne enthalten sind. Weiterhin ist zu sehen, daß die Verteilung der Silberkörner über diesen Strukturen fast genauso eng begrenzt ist wie über dem Y-Chromosom in der Metaphase (Abb. 20, e). Das deutet auf eine ähnlich dichte Organisation dieser Sequenzen im Heterochromatin der Interphasekerne wie im extrem kondensierten Chromatin von Metaphase-Chromosomen hin.

4. Quantifizierung der Y_S-Sequenzen im Genom von D. hydei

Das Y-Chromosom umfaßt etwa 10% der Gesamt-DNA von D. hydei-Männchen (Hennig, 1972; Zacharias et al., 1982); sein kurzer Arm macht davon etwa 1/10 bis 1/5, also 1 - 2% des Gesamtgenoms aus. Um einen groben Eindruck davon zu bekommen, welchen Anteil hieran die Y_S-Sequenzen haben, wurden bekannte DNA-Mengen aus Männchen und aus dem Klon Y_S11 nach der Verdauung mit Sal I in jeweils abgestuften Konzentrationen gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Southern-Filter mit ^{32}P-markierter DNA aus Y_S11 hybridisiert.

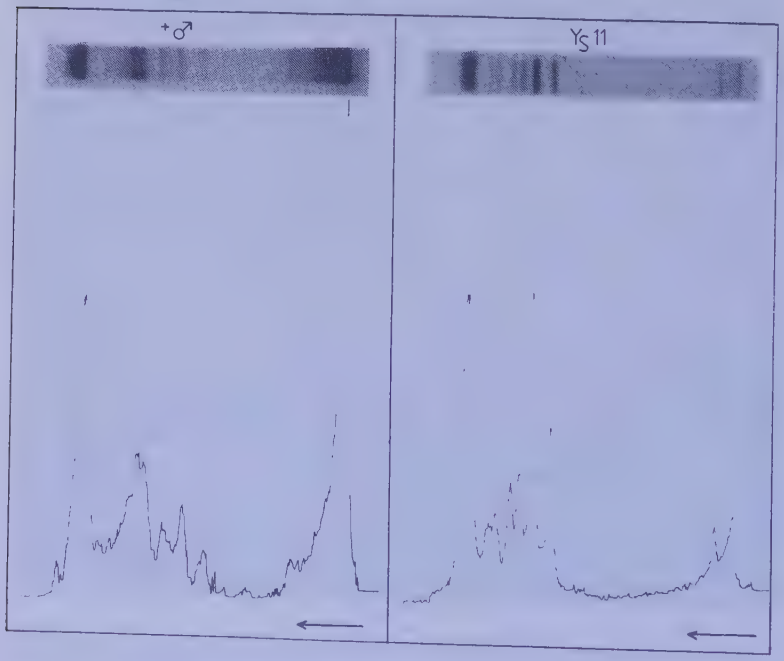


Abb. 21: Hybridisierung von Sal I-verdauter DNA aus Männchen und dem Phagen Y_S11 mit ^{32}P-markierter Y_S11-DNA zur Quantifizierung der Y_S-Sequenzen im Genom. Darunter: densitometrische Quantifizierung der autoradiographischen Signale im Chromoscan. Beide densitometrischen Profile sind im gleichen Maßstab aufgetragen, so daß ihre Flächen direkt verglichen werden können.

Die entsprechenden autoradiographischen Signale im linearen Schwärzungsbereich (Männchen-DNA: 0.5 µg; Y_S-DNA: 0.01 µg) wurden photometrisch quantifiziert (Densitogramme in Abb. 21). Für die Bestimmung der Menge an Y_S-Sequenzen im Genom wurden nur die Insert-Banden des Phagen Y_S11 berücksichtigt. Als Berechnungsgrundlage diente die von H. Bünemann ermittelte durchschnittliche Insert-Länge von 14.2 kb pro Klon (Durchschnittswert von 10 Klonen der Bibliothek), da mit keinem der verwendeten Restriktionsenzyme eine exakte Bestimmung der Insert- Größe für die Y_S-Klone möglich war. Das Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA in dem Y_S11-Phagen beträgt dann 1:2. Unter dieser Annahme ergäbe sich für die Sal I-Familie ein Anteil von etwa 1% an der DNA des Gesamt-Genoms. Infolgedessen sollte ein substantieller Teil der DNA im kurzen Arm des Y-Chromosoms aus diesen Sequenzen bestehen.

Die vorgenommene Quantifizierung kann nur eine grobe Abschätzung sein. Mögliche Fehlerquellen sind u.a. der unvollständige Transfer der Y_S-Sequenzen im hochmolekularen Bereich sowie eine Über- oder Unterschätzung der tatsächlichen Insert-Länge.

V. DISKUSSION

Für ein Verständnis der Funktion des Y-Chromosoms bei der Steuerung der Differenzierung männlicher Keimbahnzellen von D. hydei ist die Kenntnis der Struktur dieses Chromosoms auf molekularer Ebene Voraussetzung. Die Aufklärung der molekularen Substruktur impliziert die Forderung nach der Isolierung und Charakterisierung möglicher Y-chromosomenspezifischer DNA-Sequenzen. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, solche Sequenzen erstmals durch den Einsatz des Verfahrens der heterogenen DNA/DNA-Sättigungshybridisierung (Bünemann, 1982; Bünemann et al., 1982) zu isolieren.

Die Methode der heterogenen DNA/DNA-Hybridisierung war speziell zur Anreicherung und Isolierung chromosomenspezifischer DNA-Sequenzen konzipiert worden. Bei der Formulierung des Konzepts wurde von der DNA-Reassoziationsgeschwindigkeit in homogener Lösung ausgegangen. Erst bei der Untersuchung der maßgeblichen Parameter an der DNA des Prokaryonten E. coli (Bünemann, 1982) stellte sich dann heraus, daß die Reaktion der Hybridbildung zwischen immobilisierter und mobiler DNA etwa um eine Größenordnung langsamer abläuft als die entsprechende Reaktion in homogener Lösung. Damit ergab sich für die Anwendung dieses Verfahrens auf das ca. 30-bis 50-fach komplexere Genom von D. hydei hinsichtlich der Anreicherung hypothetischer, Y-spezifischer "unique"-Sequenzen das Problem einer sehr langen Reaktionsdauer.

Einen die Geschwindigkeit der Hybridisierungsreaktion limitierenden Faktor stellte die maximal erreichte Konzentration an immobilisierter DNA (mg DNA/g feuchtes Trägermaterial) dar. Für das verwendete Trägermaterial, Sephacryl S-500 betrug sie sowohl nach der Kupplung über das BrCN-(Arndt-Jovin et al., 1975) als auch über das Diazotierungsverfahren (Seed, 1982) etwa 0.5 mg/g Feuchtmaterial (vgl. Tab. 4). Da ein Gramm feuchtes Trägermaterial unter Reaktionsbedingungen ungefähr ein Volumen von 1 cm^3 einnimmt, beträgt die Konzentration der immobilisierten DNA rechnerisch 0.5 mg/ml. Unter Berück-

sichtigung der in etwa um eine Größenordnung langsameren Kinetik der heterogenen zur homogenen Hybridisierungsreaktion, würde die für 90% Renaturierung erforderliche Zeit für die heterogene DNA/DNA-Hybridisierung demnach ca. 50 Tage betragen (vgl. $C_o t$-Analyse von D. hydei-DNA in homogener Lösung, Abb. 3).

Ein weiteres Problem bei der Anwendung dieses Verfahrens auf D. hydei ergibt sich aus der Zusammensetzung des Genoms aus den verschiedenen, für Eukaryonten typischen Komplexitätsklassen hochrepetitiver (HR), mittelrepetitiver (MR) und "unique" (U) DNA, da die Geschwindigkeiten der Reaktionskinetiken der einzelnen Komponenten um mehrere Größenordnungen differieren. Das hat zur Folge, daß der Grad der Anreicherung, welcher maßgeblich von der Vollständigkeit der Hybridisierungsreaktion abhängt, für die verschieden komplexen DNA-Komponenten unterschiedlich sein muß.

In der Arbeit wurde deshalb versucht, diesen verschiedenen Einschränkungen dadurch gerecht zu werden, daß die Gesamt-DNA zunächst über HAP nach Komplexitätsklassen vorfraktioniert wurde. Es zeigte sich jedoch, daß erst durch den Prozeß der nachfolgenden Vorhybridisierung (s. Schema 1) DNA-Fraktionen gewonnen werden konnten, die eine unbedingt erforderliche, weitgehend quantitative Hybridisierung an die immobilisierte DNA ermöglichten (s. Tab. 3). Außerdem konnte auf diese Weise die Fraktion der MR-DNA auch hinsichtlich der Komplexität hochgradig vereinheitlicht werden (vgl. MR- und MR(v)-DNA in Abb. 4 bzw. 5). Die Parameter der Anreicherungshybridisierung konnten durch entsprechende Kontrollexperimente soweit optimiert werden, daß für die mittel- und hochrepetitive Fraktion schließlich eine theoretische Anreicherung um etwa zwei Größenordnungen (bezogen auf das Gesamtgenom) erzielt wurde (s. Tab. 4).

Ein unerwartetes Ergebnis der Anreicherungshybridisierung war die relativ große Menge nicht zu hybridisierender DNA innerhalb der HR-Fraktion (8.8%) gegenüber der analogen Hybridi-

sierung gegen Männchen-DNA (1.6%). Es mußte deshalb auf einen recht hohen Anteil (ca. 7%) Y-spezifischer Sequenzen in dieser Fraktion geschlossen werden, im Widerspruch zu den publizierten Befunden, nach denen der Anteil hochrepetitiver Sequenzen an der Y-chromosomalen DNA sehr gering sein sollte (Hennig, 1972; Renkawitz, 1978). Der erreichte Anreicherungsfaktor für die "unique"-Fraktion betrug nur 8.6 und war damit um eine Größenordnung geringer. - Da die wesentlich schlechtere Anreicherung für die U-DNA ihre Ursachen primär in der extrem langen Reaktionszeit hatte, wurde versucht, die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zusätze zum Reaktionsmedium zu beschleunigen. Leider hatten diese Experimente nicht den gewünschten Erfolg, da neben der tatsächlich beobachteten Beschleunigung der Reaktionen im Falle von NaCl und LiCl unspezifische DNA-Adsorption im gesamten Kreislaufsystem stattfand. Bei Dextransulfat war die Beschleunigung von einer Netzwerkbildung begleitet, die sich durch ein "trapping" der zirkulierenden DNA in der Matrix des Trägermaterials Sephacryl S-500 bemerkbar machte. -

Eine quantitative Überprüfung der theoretischen Anreicherungsfaktoren ist prinzipiell möglich, aber relativ aufwendig. Eine Möglichkeit dazu besteht in der Klonierung der angereicherten DNA und der Hybridisierung einer Stichprobe von Klonen gegen genomische Southern-Filter von Männchen- und Weibchen-DNA. Durch den Vergleich mit klonierter, nicht angereicherter Männchen-DNA wäre eine statistische Aussage über die relative Häufigkeit Y-spezifischer Sequenzen in den Anreicherungsfraktionen möglich. Weiterhin kann auf diese Weise auch ermittelt werden, aus welchen Komplexitätsklassen sich die Y-chromosomenspezifische DNA zusammensetzt. Zum Beispiel würde der Anteil Y-spezifischer "unique"-Sequenzen am Genom unter 1 Promille betragen, wenn bei einem Anreicherungsfaktor in der Größenordnung von 10 (8.6, s. Tab. 4) von 100 Klonen keiner ein Y-spezifisches Signal gäbe.

Aus zeitlichen Gründen mußte auf diesen quantitativen Beweis der Anreicherung verzichtet werden. Stattdessen wurde die An-

reicherung Y-spezifischer Sequenzen in den Fraktionen von HR- und MR-DNA lediglich qualitativ bestätigt, indem jeweils ein Teil der angereicherten und radioaktiv markierten DNA gegen genomische Southern-Filter von Männchen und Weibchen hybridisiert wurde. In der Tat zeigen beide Proben bei einem solchen Experiment (vgl. Abb. 8, a und b) eine etwa gleichermaßen ausgeprägte, präferentielle Hybridisierung mit der Männchen-DNA. Eine entsprechende Hybridisierung wurde für die "unique"-DNA nicht durchgeführt, in einer radioaktiven Probe dieser Anreicherungsfraktion wäre die spezifische Aktivität für einzelne, Y-chromosomenspezifische Sequenzen viel zu gering, um unterschiedlich intensive Signale zu erzeugen.

Der Ausgang dieser ersten Hybridisierungsexperimente hatte somit gezeigt, daß die Anreicherung Y-chromosomenspezifischer DNA-Sequenzen in den beiden Fraktionen repetitiver DNA ausreichte, um selbst bei einer Hybridisierung gegen Gesamt-DNA aus Männchen und Weibchen einen deutlichen Unterschied zu erzeugen. Damit waren für ein differentielles "Screening" einer Bibliothek von DNA aus D. hydei-Männchen in Lambda EMBL 3-Phagen mit DNA-Proben dieser Fraktionen sehr günstige Voraussetzungen zur Identifizierung Y-spezifischer Klone gegeben. Aufgrund der Tatsache, daß von der HR_Y-DNA im Vergleich zur Y-angereicherten MR-DNA eine ca. 10-fach größere DNA-Menge (4 µg zu 0.4 µg) gewonnen werden konnte, wurden die Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von Klonen Y-spezifischer DNA im Rahmen der Arbeit auf diese Fraktion beschränkt.

Die Ergebnisse, die mit Replica-Filtern von einer Platte mit ca. 7000 rekombinanten Phagen und deren Hybridisierung mit HR_Y- bzw. HR-DNA aus Weibchen erzielt wurden, bestätigen die vermutete Anreicherung. Von den jeweils 120 - 160 Hybridisierungssignalen in den beiden entsprechenden Autoradiographien (vgl. Abb. 10, A und B bzw. Abb. 22, c und d) sind nur 2 - 3 positionsgleich, d.h. fast sämtliche der mit der HR_Y-DNA hybridisierenden Klone signalisieren Y-Spezifität.

Die Effektivität der Anreicherung und die dadurch bedingte hohe Spezifität der DNA-Probe wurde durch Hybridisierung von entsprechenden Replica-Filtern mit nicht angereicherter HR-DNA aus Männchen und HR-DNA aus Weibchen eindeutig dokumentiert. Im Gegensatz zum entsprechenden Experiment mit HR_Y-DNA weisen hier fast alle Hybridisierungssignale die gleiche Position auf (vgl. Abb. 22, a und b). Weniger als 10 Signale des mit der nicht angereicherten HR-DNA aus Männchen hybridisierten Filters deuten auf Y-spezifische Phagen-Klone hin. Noch weniger ergiebig ist naturgemäß der Einsatz von Gesamt-DNA für die Isolierung repetitiver, Y-spezifischer Sequenzen von D. hydei bei einem analogen Experiment, das mit plasmidklonierter DNA durchgeführt wurde (Lifschytz, 1979; Vogt & Hennig, 1983; Lifschytz et al., 1983). Da hier die HR-Komponente nur etwa 10% der DNA-Probe ausmacht, muß das Auflösungsvermögen gegenüber dem hier beschriebenen Experiment insgesamt um zwei Größenordnungen schlechter sein. Hiermit wird der große Vorteil offenkundig, den das geschilderte Anreicherungsverfahren für die Identifizierung und Isolierung von chromosomenspezifischen Sequenzen darstellt.

Hinsichtlich der Signalintensität waren 2 - 3 Klassen von Klonen zu unterscheiden. Für eine vorläufige Charakterisierung konnte aus Zeitgründen nur eine Stichprobe von 10 - 20 Klonen aus der Kategorie der schwächeren Signalintensität (Y_S) und einige der Klone, welche ein starkes Hybridisierungssignal gaben (Y_L), isoliert werden.

Zur Kontrolle der Y-Spezifität wurde die ^{32}P-markierte DNA einzelner, isolierter Klone beider Kategorien gegen genomische Southern-Filter mit restriktionsverdauter Männchen- und Weibchen-DNA hybridisiert (Abb. 12, 13). Dabei zeigten sämtliche der getesteten Y_S-Klone ausschließlich zur Männchen-DNA Homologien, ebenso wie einer der untersuchten Y_L-Klone (Y_L11). Die DNAs zweier anderer Y_L-Phagen hybridisierten mehr (Y_L12) oder weniger (Y_L14) präferentiell mit der Männchen-DNA. Die schwache Hybridisierung mit der DNA aus Weibchen zeigte allerdings, daß die entsprechenden Sequenzen außer auf dem Y auch auf anderen Chromosomen vorkommen müssen.

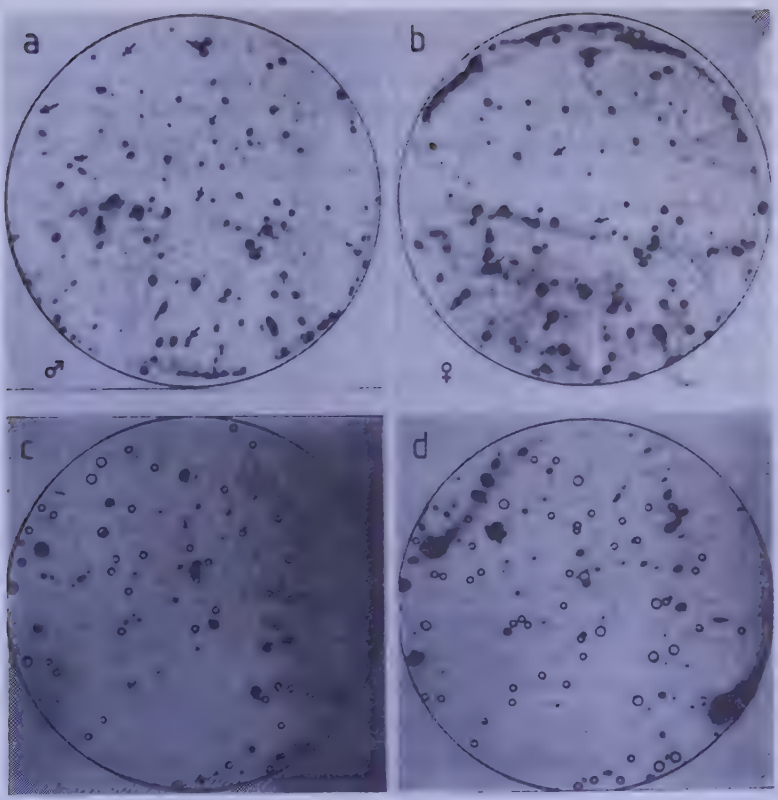


Abb. 22: Hybridisierungen von Replica-Filtern zweier Platten mit je ca. 7000 Phagen-Plaques aus der Bibliothek von D. hydei-Männchen-DNA in Lambda EMBL 3-Phagen. Die beiden Replica-Filter der 1. Platte wurden mit ^{32}P-markierter HR-DNA aus Männchen (a) und HR-DNA aus Weibchen (b) hybridisiert. Die Pfeile in a und b kennzeichnen nichtübereinstimmende Signale in den beiden Autoradiographien.
Die Hybridisierung der Replica-Filter von der 2. Platte erfolgte mit HR_Y-DNA (c) und HR-DNA aus Weibchen (d). Die Kreise in c und d bezeichnen Positionen, auf denen in der jeweils anderen Autoradiographie Hybridisierungssignale zu erkennen sind.

Die verschiedenen, charakteristischen Hybridisierungsmuster deuten auf wenigstens drei unterschiedliche Sequenzfamilien hin. Ein besonders deutliches Muster zeigten die mit den Y_S-Klonen hybridisierenden Sequenzen im Genom nach Verdauung mit Sal I (Abb. 12). Die unregelmäßige Struktur des Bandenmusters läßt darauf schließen, daß diese Familie nicht aus einer einfachen "repeat unit" aufgebaut ist.

Obwohl jeder der analysierten Y_S-Klone sein eigenes, individuelles Sal I-Muster hatte (Abb. 14), waren die Hybridisierungsmuster mit der gleichfalls Sal I-verdauten Männchen-DNA für vier verschiedene Y_S-Sequenzen vollkommen identisch (Abb. 12). Daraus ist zu folgern, daß diese isolierten, Y-spezifischen Sequenzen derselben, offensichtlich sehr heterogenen Sequenzfamilie (Sal I-Familie) angehören. Tatsächlich konnte diese Vermutung durch ein Kreuzhybridisierungsexperiment mit Sal I-verdauter DNA aus sechs verschiedenen Y_S-Phagen bewiesen werden (Abb. 14). Sämtliche "Insert"-Fragmente dieser Klone wiesen zueinander Homologien auf. Weiterhin war daraus trotz der Sequenzheterogenität auf eine "geclusterte" Anordnung dieser homologen Sequenzeinheiten zu schließen. Ein allen Klonen gemeinsames Fragment bei etwa 0.6 kb könnte die Länge der vermutlichen "repeat unit" anzeigen.

Die mit den Y_L-Klonen hybridisierenden genomischen Sequenzen sind mit Sal I entweder überhaupt nicht (Y_L11 und Y_L14) oder kaum (Y_L12) verdaubar (vgl. Abb. 13). Nach Verdauung mit Alu I zeigen die mit Y_L11 und Y_L12 hybridisierenden Sequenzen der Männchen-DNA dasselbe Verteilungsmuster, während die zu Y_L14 homologen Sequenzen davon völlig abweichen. Die hierdurch angedeutete Verwandtschaft der in Y_L11 und Y_L12 klonierten Sequenzen konnte wieder durch eine Kreuzhybridisierung bestätigt werden (Abb. 15). Mit diesem Experiment wurde gleichzeitig demonstriert, daß die Y_L11- bzw. Y_L12-Sequenzen zu den Sequenzen der Sal I-Familie keinerlei Homologien aufweisen, während eine sehr schwache Verwandtschaft zu den Y_L14-Sequenzen besteht.

Durch Hybridisierungen gegen Southern-Filter mit DNA aus Männchen verschiedener Translokationsstämme, welche nur bestimmte, unterschiedliche Fragmente des Y-Chromosoms enthalten (Abb. 16, 17) sowie durch *in situ*-Hybridisierungen gegen Metaphase-Chromosomen von Wildtyp-Männchen (Abb. 19), konnten die beschriebenen Sequenzen definierten Bereichen des Y-Chromosoms zugeordnet werden. Nach den Ergebnissen dieser Experimente sind die Sequenzen der Sal I-Familie wahrscheinlich ausschließlich auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms lokalisiert, während die beiden anderen Sequenzfamilien (Y_L11 und Y_L14) dem distalen Bereich des langen Arms zuzuordnen sind. Ob die Y_L-Sequenzfamilien mit den in der gleichen Region gelegenen Fertilitätsfaktoren (P, F, s. Schema in Abb. 18) korreliert werden können, bleibt noch zu klären.

Die Y_S-Sequenzen sind im Unterschied zu einer von Vogt und Hennig (1982) beschriebenen und ebenfalls für den kurzen Arm des Y-Chromosoms spezifischen Sequenzfamilie, welche außerdem mit den als "Schlingen" (S) bezeichneten Lampenbürstenschleifen assoziiert wird, nicht mit Eco RI verdaubar. Sie konnten durch *in situ*-DNA/RNA-Hybridisierungen an Spermatocytenkernpräparaten bisher auch nicht mit den "Schlingen" korreliert werden.

Durch densitometrische Quantifizierung autoradiographischer Signale (Abb. 21) wurde der Anteil der Y_S-Sequenzen am Gesamtgenom auf etwa 1.0% geschätzt. Unter der Annahme, daß die Länge der "repeat unit" 0.6 kb beträgt, ergäbe sich bei einer Größe des *D. hydei*-Genoms von ca. 1.34×10^8 bp (s. III. 1.1.) eine Kopienzahl von >2000. Neben den von Schäfer und Kunz (1975) ebenfalls auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms lokalisierten 250 rRNA-Genen mit 11 kb pro Einheit (Renkawitz-Pohl et al., 1980) und den zwei als "Schlingen" (S) bezeichneten Fertilitätsfaktoren, auf die jeweils 260 kb DNA entfallen (Grond et al., 1983), würden die Sequenzen der Sal I-Familie mit etwa 1200 kb einen substantiellen Teil der DNA des kurzen Arms darstellen.

Angesichts dieser relativ großen DNA-Menge der Y_S-Sequenzen stellt sich die Frage, wieso diese Y-chromosomale Komponente zuvor noch nicht isoliert werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre die ausgeprägte Sequenzheterogenität innerhalb dieser Familie. Neben der sehr unregelmäßigen Verteilung der Sal I-Schnittstellen wird durch das Schmelzverhalten dieser DNA hierfür ein weiteres Indiz gegeben. So zeigten die in einem einzelnen Y_S-Phagen klonierten DNA-Sequenzen nach der Renaturierung eine starke Verschiebung des Tm-Wertes um 2 - 7°C gegenüber der nativen Form (Bünemann, pers. Mitt.). Dieser "Tm-shift" deutet auf eine häufige Fehlpaarung der Basen bei der Renaturierung hin, wodurch die Bildung stabiler Hybride erschwert wird. Darin könnte auch die, trotz der Menge dieser DNA im Genom, relativ geringe Signalstärke der Y_S-Klone beim "Screening" mit HR_Y-DNA begründet sein. Es ist offensichtlich, daß beim "Screening" mit einer DNA-Probe, in der die gesuchten Sequenzen mit etwa 100-fach geringerer Häufigkeit vorkommen (Gesamt-DNA), die Aussichten für eine Identifizierung derartiger Klone sehr schwach sein müssen. Die Sequenzheterogenität dürfte auch ein Grund dafür sein, weshalb diese DNA in hochauflösenden CsCl-Gradienten nicht als Satellitenkomponente in Erscheinung trat (Renkawitz, 1977; 1978). Weiterhin könnte es sein, daß die Y_S-Sequenzen in den bisher für das "Screening" verwendeten Genbanken nicht enthalten waren, weil die zu deren Herstellung benutzten Restriktionsenzyme Pst I und Eco RI (Vogt und Hennig, 1982 bzw. Lifschytz et al., 1983) die Y_S-Sequenzen nicht oder nur selten schneiden (Bünemann, pers. Mitt.).

Die hier isolierten Sequenzen repräsentieren möglicherweise typische Merkmale Y-chromosomaler DNA. Wie alle anderen bisher in der Literatur beschriebenen, Y-chromosomalen Sequenzen von *D. hydei* (Renkawitz, 1978; Lifschytz, 1979; Vogt und Hennig, 1982; Lifschytz et al., 1983) gehören sie repetitiven Sequenzfamilien an. Die sehr unregelmäßige Verteilung von Restriktionsschnittstellen deutet auf eine ausgeprägte Sequenzheterogenität innerhalb der einzelnen, unterschied-

lichen Familien hin. Trotz dieser Heterogenität, insbesondere der Sal I-Familie, zeigen die betreffenden Sequenzen kein disperses Verteilungsmuster. Offenbar sind sie vielmehr als "tandem repeat cluster" in definierten Chromosomenbereichen organisiert, womit allerdings nicht ausgeschlossen ist, daß die "cluster" von einzelnen "unique" oder mittelrepetitiven Sequenzen unterbrochen sein können. Zumindest für die Sal I-Familie scheint das jedoch selten der Fall zu sein, da sämtliche DNA-Fragmente aus den bisher getesteten Y_S-Klonen zueinander Homologien zeigen und demnach keine oder nur sehr wenig andere DNA enthalten können.

Aus der Literatur ist außerdem bekannt, daß bestimmte Y-chromosomale Sequenz-Familien von D. hydei Sequenzen enthalten, die auch auf anderen Chromosomen vorkommen (Renkawitz, 1978; Lifschytz, 1979; Vogt und Hennig, 1982; Lifschytz et al., 1983). Die Y_L14-Familie ist hierfür ein weiteres Beispiel.

Die drei vorläufig charakterisierten Sequenzfamilien repräsentieren nur einen Teil der beim "Sreening" mit HR_Y-DNA hybridisierenden Klone. Für eine weitergehende Analyse der Y-chromosomalen DNA ist auch die Isolierung der übrigen Klone notwendig. Durch den Einsatz der MR_Y-DNA können wahrscheinlich zusätzliche Y-chromosomale Sequenzen isoliert werden. Insgesamt ist zu hoffen, daß die so erhaltenen Sequenzen an verschiedenen Stellen des Y-Chromosoms Ansatzpunkte für eine Auflösung der molekularen Substruktur dieses Chromosoms einschließlich der beschriebenen Fertilitätsfaktoren bieten. Die offensichtlich "geclusterte" Organisation der bereits isolierten Y-chromosomenspezifischen Sequenzen läßt es möglich erscheinen, beispielsweise über ein "chromosome walking" auch Zugang zu einer Analyse der Struktur benachbarter Chromosomenbereiche zu erhalten. Auf diese Weise könnten auch potentielle Y-chromosomale "unique"-Sequenzen erfaßt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Methode der heterogenen DNA/DNA-Sättigungshybridisierung (Bünemann, 1982) wurde erstmals zur Isolierung chromosomenspezifischer DNA-Sequenzen auf das Genom von D. hydei angewendet.

2. Durch eine möglichst vollständige Hybridisierung der nach Komplexitätsklassen über HAP vorfraktionierten DNA aus Männchen gegen einen Überschuß immobilisierter DNA der jeweils gleichen Komplexitätsklasse aus Weibchen wurden Y-chromosomenspezifische Sequenzen unterschiedlich stark angereichert.

3. Für die Fraktionen der hoch- und mittelrepetitiven DNA konnte eine etwa 100-fache und für die "unique"-DNA eine ca. 10-fache Anreicherung bezogen auf das Gesamtgenom erreicht werden.

4. Die erzielte Anreicherung wurde für die beiden repetitiven Fraktionen durch eine Hybridisierung von ^{32}P-markierten Aliquots der Y-angereicherten DNA gegen "Southern"-Filter mit DNA aus Männchen und Weibchen bestätigt.

5. Die Y-angereicherte hochrepetitive DNA diente zur Identifizierung und Isolierung Y-chromosomenspezifischer DNA-Sequenzen über ein differentielles "Screening" einer Bibliothek des D. hydei-Männchen-Genoms in Lambda EMBL 3-Phagen.

6. Die isolierten DNA-Sequenzen gehören drei verschiedenen Y-chromosomalen Sequenzfamilien an, welche durch in situ-Hybridisierungen an Metaphase-Chromosomen und durch "Southern"-Filterhybridisierungen gegen Genotypen mit defizienten Y-Fragmenten auf definierten, unterschiedlichen Bereichen des Y-Chromosoms lokalisiert werden konnten.

7. Die Isolierung Y-spezifischer DNA-Sequenzen über ein differentielles "Screening" ist mit Y-angereicherter DNA wesentlich effizienter als mit einer entsprechenden, nicht angereicherten DNA-Fraktion.

VII. LITERARURVERZEICHNIS

Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., Bähr, W., Frischauf, A., and Marquardt, M. (1975). Covalent attachment of DNA to agarose. Eur. J. Biochem. 54, 411.

Beck, H. (1976). New compound (1) chromosomes and the production of large quantities of X/O males in Drosophila hydei. Genet. Res., Camb. 26, 313.

Benton, W.D., and Davis, R.W. (1977). Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196, 180.

BIO-RAD (1981). Hydroxylapatite. Katalog G, 57.

Bonner, J.J., and Pardue, M.L. (1976). Ecdysone-stimulated RNA synthesis in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 58, 87.

Britten, R.J., and Kohne, D.E. (1968). Repeated sequences in DNA. Science 161, 526.

Bünemann, H. (1982). Immobilization of denatured DNA to macroporous supports: II. Steric and kinetic parameters of heterogeneous hybridization reactions. Nucl. Acids Res. 10, 7181.

Bünemann, H., Westhoff, P., and Herrmann, R.G. (1982). Immobilization of denatured DNA to macroporous supports: I. Efficiency of different coupling procedures. Nucl. Acids Res. 10, 7163.

Cameron, J.R., Phillipsen, P., and Davis, R.W. (1977). Analysis of chromosomal integration and deletions of yeast plasmids. Nucl. Acids Res. 4, 1429.

Chang, C.T., Hain, T.C., Hutton, J.R., and Wetmur, J.G. (1974). Effects of microscopic and macroscopic viscosity on the rate of renaturation of DNA. Biopolymers 13, 1847.

Clarke, L., and Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell 9, 91.

Cobel-Geard, S.R., and Gay, H. (1980). A new simplified method for the preparation of neuroblast mitotic chromosomes from D. melanogaster. Drosophila Information Service 55, 148.

Denhardt, D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 641.

Eckes, B. (1981). Molekulare Charakterisierung der mitochondriellen DNA von Drosophila hydei und Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Düsseldorf.

Gall, J.G. (1981). Chromosome structure and the C-value paradox. J. Cell Biol. 91, 3s.

Gall, J.G., and Pardue, M.L. (1971). Nucleic acid hybridization in cytological preparations. Meth. Enzymol. 21, 470.

Glätzer, K.H. (1975). Visualization of gene transcription in spermatocytes of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl) 53, 371.

Glätzer, K.H., and Meyer, G.F. (1981). Morphological aspects of the genetic activity in primary spermatocyte nuclei of Drosophila hydei. Biol. Cell 41, 165.

Grond, C.J., Siegmund, J., and Hennig, W. (1983). Visualization of a lampbrush loop-forming fertility gene in Drosophila hydei. Chromosoma (Berl), 88, 50.

Hayashi, S., Gilham, I.C., Delany, A.D., and Tenner, G.M. (1978). Acetylation of chromosome squashes of Drosophila melanogaster decreases the background in autoradiographs from hybridization with (^{125}J)-labeled RNA. J. Histochem. and Cytochem. 26, 677.

Hennig, W. (1968). Ribonucleic acid synthesis of the Y-chromosome of Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 38, 227.

Hennig, W. (1972). Highly repetitive DNA sequences in the genome of Drosophila hydei. I. Preferential localization in the X-chromosamal heterochromatin. J. Mol. Biol. 71, 407.

Hennig, W. (1972). Highly repetitive DNA sequences in the genome of Drosophila hydei. II. Occurrence in polytene tissues. J. Mol. Biol. 71, 419.

Herrnstadt, C. (1982). Identifizierung Y-spezifischer RNA in männlichen Keimzellen von Drosophila hydei. Dissertation, Düsseldorf.

Hess, O. (1965). Strukturdifferenzierungen im Y-Chromosom von Drosophila hydei und ihre Beziehung zu Genaktivitäten: III. Sequenz und Lokalisation der Schleifenbildungsorte. Chromosoma (Berl) 16, 222.

Hess, O. (1967). Complementation of genetic activity in translocated fragments of the Y-chromosome in Drosophila hydei. Genetics 56, 283.

Hess, O. (1968). The function of the lampbrush loops formed by the Y-chromosome of Drosophila hydei in spermatocyte nuclei. Molec. Gen. Genetics 103, 58.

Hess, O. (1970). Genetic function correlated with unfolding of lampbrush loops by the Y-chromosome in spermatocytes of Drosophila hydei. Molec. Gen. Genetics 106, 328.

Hess, O. (1976). Genetics of Drosophila hydei Sturtevant. In: Novitzky, E., Ashburner, M. (eds.) "The genetics and biology of Drosophila". 1c, 1343.

Hess, O., and Meyer, G.F. (1968). Genetic activities of the Y-chromosome in Drosophila during spermatogenesis. Adv. Genet. 14, 171.

Holmquist, G. (1975). Hoechst 33258 fluorescent staining of Drosophila chromosomes. Chromosoma (Berl) 49, 333.

Knust, E. (1979). Ribonukleoproteinpartikel aus Kernen primärer Spermatocyten von Drosophila hydei: Charakterisierung der RNA und ihre Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Dissertation, Düsseldorf.

Lewin, B. (1980). In: "Gene Expression 2", 503 - 530; Verlag J. Wiley and Sons, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore.

Lifschytz, E. (1979). A procedure for the cloning and identification of Y-specific middle repetitive sequences in Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 133, 267.

Lifschytz, E., Hareven, D., Azriel, A., and Brodsley, H. (1983). DNA clones and RNA transcripts of four lampbrush loops from the Y-chromosome of Drosophila hydei. Cell 32, 191.

Macgregor, H.C., and Mizuno, S. (1976). In situ hybridization of "nick-translated" ^{3}H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. Chromosoma (Berl) 54, 15.

Maniatis, T., Jeffrey, A., and Kleid, D. (1975). Nucleotide sequence of the rightward operator of phage lambda. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1184.

Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacey, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sinn, D.K., and Efstradiadis, A. (1978). The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15, 687.

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3, 208.

Melchior, Jr., W.B., and v. Hippel, P. (1973). Alteration of the relative stability of dA·dT and dG·dC base pairs in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 298.

Orosz, J.M. and Wetmur, J.G. (1977). DNA melting temperatures and renaturation rates in concentrated alkylammonium salt solutions. Biopolymers 16, 1183.

Pardue, M.L., and Gall, J.G. (1975). Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. In: "Meth. Cell Biol." 10, 1.

Renkawitz, R. (1977). Isolierung, Charakterisierung und Lokalisation bestimmter heterochromatischer DNA-Fraktionen von Drosophila hydei. Dissertation, Düsseldorf.

Renkawitz, R. (1978). Characterization of two moderately repetitive DNA components localized within the ß-heterochromatin of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl) 66, 225.

Renkawitz, R. (1978). Two highly repetitive DNA satellites of Drosophila hydei localized within the ∠-heterochromatin of specific chromosomes. Chromosoma (Berl) 66, 237.

Renkawitz-Pohl, R., Glätzer, K.H., and Kunz, W. (1980). Characterization of cloned ribosomal DNA from Drosophila hydei. Nucl. Acids Res. 8, 4593.

Schäfer, U., and Kunz, W. (1975). Two seperated nucleolus organizers on the Drosophila hydei Y-chromosome. Molec. Gen. Genet. 137, 365.

Shields, G., and Sang, J.H. (1977). Improved medium for culture of Drosophila embryonic cells. Drosophila Information Service 52, 161.

Schwochau, M. (1979). Die Technik der präparativen Ultrazentrifugation. GIT Fach. Lab. 23, 1010.

Seed, B. (1982). Diazotable acrylamine cellulose papers for the coupling and hybridization of nucleic acids. Nucl. Acids Res. 10, 1799.

Smith, S.S., and Thomas, C.A., Jr. (1981). The two-dimensional restriction analysis of Drosophila DNAs: males and females. Gene 13, 395.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503.

Thomas, M., and Davis, R.W. (1975). Studies on the cleavage of bacteriophage λDNA with Eco RI restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 91, 315.

Thuring, R.W.J., Sanders, J.P.M., and Borst, P. (1975). A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. Analyt. Biochem. 66, 213.

Vogt, P., and Hennig, W. (1983). Y-chromosomal DNA of Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 167, 37.

Wetmur, J.G. (1975). Acceleration of DNA renaturation rates. Biopolymers 14, 2517.

Zacharias, H. Hennig, W., and Leoncini, O. (1982). Microspectrophotometric comparison of the genome sizes of Drosophila hydei and some related species. Genetica 58, 153.

Zielke, U. (1978). Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der Mitochondrien von Drosophila hydei. Schriftliche Hausarbeit in Biologie. Künstlerisch/Wissenschaftliches Prüfungsamt, Düsseldorf.

VIII. ANMERKUNGEN

Herrn Privat-Dozent Dr. Hans Bünemann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die ausgezeichnete Betreuung. Den beiden anderen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, der technischen Assistentin Frau Cornelia Gieseler und Herrn Diplom-Biologen Meinhard Wlaschek gilt mein Dank für ihre intensive Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Genetik und für sein Interesse und seine Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. Oswald Hess.

Frau Diplom-Biologin Beate Eckes danke ich für die Überlassung der in den Vorversuchen eingesetzten Fliegen-DNA.

Für viele anregende Diskussionen und praktische Ratschläge möchte ich Frau Diplom-Biologin Gabriele Petersen, Frau Dr. Corinna Herrnstadt, Frau Dr. Mireille Schäfer, Herrn Dr. Ulrich Schäfer, Herrn Privat-Dozent Dr. Karl-Heinz Glätzer, Herrn Prof. Dr. Werner Kunz und Herrn Prof. Dr. Martin Schwochau besonders danken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Katharina Girod, Frau Brigitte Ingwersen und Frau Eva Pejdal für ihre Unterstützung beim Schreiben des Manuskriptes.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch Mittel, die Herrn Privat-Dozent Dr. Hans Bünemann von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden (Az. Bü 342/2).

IX. LEBENSLAUF

Name:	Alexander Awgulewitsch
Datum und Ort der Geburt:	26. Mai 1952 in Bielefeld
Eltern:	Katharina Girod, gesch. Awgulewitsch, geb. von Anshelm Möller - Eugen Awgulewitsch
Schulbesuch:	1959 - 1963 Grundschule 1963 - 1964 Gymnasium 1964 - 1969 Realschule 1969 - 1971 Höhere Handelsschule 1971 - 1973 Gymn. Zweig der Höheren Handelsschule - Abitur.
Wehrdienst:	Juli '73 - Februar '74
Zivildienst:	März '74 - Oktober '74
Hochschulstudium:	WS 74/75 - WS 79/80 Studiengang für das Lehramt Gymnasium mit den Fächern Biologie als Hauptfach an der Universität Bielefeld und Sport als 2. Fach an der Pädagogischen Hochschule in Bielefeld. WS 76/77 Zwischenprüfung in Biologie WS 78/79 Prüfung im erziehungswiss. Begleitstud. WS 79/80 Prüfung in Biologie (Hauptfach) und Sport an der Universität Bielefeld. Die Examensarbeit wurde am Lehrstuhl für Stoffwechselphysiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Kowallik angefertigt. seit April '80 Anfertigung der Dissertation am Institut für Genetik der Universität Düsseldorf.
Praktische Tätigkeiten:	1979 - 1984 studentische bzw. wissenschaftl. Hilfskraft am Lehrstuhl für Stoffwechselphysiologie der Universität Bielefeld und am Institut für Genetik der Universität Düsseldorf. August '77 - Januar '78 Unterricht im Fach Biologie am Gymnasium.

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606